



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Imobilizace kyseliny hyaluronové na nanovláknenné substráty

Bakalářská práce

Studijní program: B3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942R002 – Nanomateriály

Autor práce: **Vojtěch Svěchota**
Vedoucí práce: Ing. Miroslava Rysová





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Immobilization of hyaluronic acid on nanofibrous substrates

Bachelor thesis

Study programme: B3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942R002 – Nanomaterials

Author: **Vojtěch Svěchota**
Supervisor: Ing. Miroslava Rysová



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Svěchota**
Osobní číslo: **M13000169**
Studijní program: **B3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Imobilizace kyseliny hyaluronové na nanovláknenné substráty**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Prostudujte literaturu a vypracujte rešerši týkající se metod zpracování a aplikací kyseliny hyaluronové ve formě nanostruktur v medicíně.
2. Ověřte minimálně jednu metodu imobilizace kyseliny hyaluronové na povrch nanovláknenného substrátu.
3. Charakterizujte funkcionalizovaný nanovláknenný substrát. Ověřte vliv proměnných procesu na jeho účinnost a na vlastnosti substrátu.
4. Výsledky shrňte a diskutujte.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **cca 40 stran**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] Bhardwaj, N. and Kundu, S. C., 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances* 28 (2010), pp. 325-347.
- [2] Yoo, H. S. et al., 2009. Surface-functionalized electrospun nanofibres for tissue engineering and drug delivery, *Advanced Drug delivery Reviews* 61 (2009), pp. 1033-1042.
- [3] Liang, D. et al., 2007. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59 (2007), pp. 1392-1412.
- [4] Kogan, G. et al., 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* 29 (2007), pp. 17-25.
- [5] Shriver-Lake, L. C. et al., 2009. Immobilization of biomolecules onto silica and silica-based surfaces for use in planar array biosensors. *Methods in Molecular Biology* 504 (2009), pp. 419-440.
- [6] Gong, F. et al., 2010. Hyaluronan immobilized polyurethane as a blood contacting material. *International Journal of Polymer Science* 2010 (2010), pp. 1-8, SSN 1687-9422.

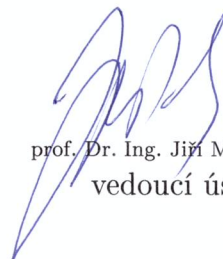
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Miroslava Rysová**

Datum zadání bakalářské práce: **20. října 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **16. května 2016**


prof. Ing. Václav Kopecký, CSc.
děkan




prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé bakalářské práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li bakalářskou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé bakalářské práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 16. 5. 2016

Podpis: 

Poděkování

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce, Ing. Miroslavě Rysové, za její ochotu, cenné rady, připomínky a čas, který mé práci věnovala. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. za pomoc při rastrovací elektronové mikroskopii. Velké díky patří Ing. Haně Tománkové, Msc. a Mgr. Markétě Schaabové za pomoc s kvantifikací NH_2 skupin. Závěrem bych velice rád poděkoval celé své rodině za podporu, bez které by tato práce nevznikla.

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá funkcionalizací povrchu křemičitých nanovláknenných substrátů s cílem imobilizace kyseliny hyaluronové.

V teoretické části jsou shrnuty poznatky získané rešerší, zaměřenou na metody zpracování a aplikaci kyseliny hyaluronové ve formě nanostruktur v medicíně. V další části rešerše jsou diskutovány metody modifikace kyseliny hyaluronové a možnosti využití anorganických nanovláknenných substrátů v medicíně.

Experimentální část se zabývá optimalizací silylační reakce, kdy jako modifikační činidlo je zde využit 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES). Byl sledován vliv koncentrace silylačního činidla a čas reakce na výsledný výtěžek aminoskupin (NH_2) kovalentně navázaných na povrch křemičitých nanovláknenných substrátů. V závislosti na výtěžnosti silylace za různých reakčních podmínek byl stanoven optimální postup pro povrchovou modifikaci křemičitých nanovláken. Další část zahrnuje imobilizaci kyseliny hyaluronové na předem modifikovaný nanovláknenný substrát, kde byl zkoumán vliv pH a čas reakce na výsledný výtěžek kyseliny hyaluronové.

Klíčová slova

Kyselina hyaluronová, modifikace, biomateriály, silylace, APTES, křemičitá nanovláknena,

Abstract

The bachelor thesis deals with surface functionalization of silica nanofibrous substrates with the goal of surface immobilization of hyaluronic acid.

The theoretical part summarizes the knowledge obtained from literature research, focusing on processing methods and applications of hyaluronic acid in the form of nanostructures in medicine. In the next section of theoretical part, there are discussed modifications of hyaluronic acid and the possibility of using inorganic nanofibrous substrates in medicine.

The experimental part deals with the optimization of silanization reaction with the use of 3-aminopropyltriethoxysilane as a modifying agent. In addition, the effect of the silanization agent concentration and reaction time on the final yield of covalently bonded amine group, were also observed. Depending on the yield of silanization under the various reaction conditions, the optimal procedure for surface modification of silica nanofibers was determined. In the case of the hyaluronic acid immobilization procedure the effect of the reaction pH and time was studied.

Key words

Hyaluronic acid, modification, biomaterials, silanization, APTES, silica nanofibers,

Obsah

1	Kyselina hyaluronová	11
1.1	Chemická struktura.....	11
1.2	Vlastnosti kyseliny hyaluronové.....	12
1.2.1	Hydrofilita.....	12
1.2.2	Vlastnosti reologické	12
1.2.3	Lubricita.....	12
1.2.4	Komerční dostupnost	13
1.3	Výskyt a funkce kyseliny hyaluronové	13
1.3.1	Kyselina hyaluronová v kůži.....	15
1.3.2	Kyselina hyaluronová v synoviální tekutině a kloubech	15
1.3.3	Kyselina hyaluronová v extracelulární matrix	16
2	Modifikace kyseliny hyaluronové	17
2.1	Modifikace karboxylové funkční skupiny (COOH).....	17
2.1.1	Amidace	17
2.1.2	Esterifikace	19
2.2	Modifikace hydroxylové funkční skupiny (OH)	21
2.2.1	Tvorba etherů.....	21
2.2.2	Esterifikace	22
2.2.3	Sítování pomocí glutaraldehydu (GTA)	22
2.2.4	Tvorba karbamátů	23
3	Biomateriály na bázi kyseliny hyaluronové	24
3.1	Nanomateriály HA	24
3.2	Hydrogely na bázi HA.....	25
3.3	Metody zpracování biomateriálů.....	26
3.3.1	Fázová separace.....	26
3.3.2	Bioprinting.....	27
3.3.3	Electrospinning.....	27
3.3.4	Odstředivé lití	27
3.3.5	Lyofilizace	28
4	Aplikace biomateriálů na bázi HA v medicíně.....	29
4.1	Výplně prostoru a hojení ran	29
4.2	Oprava kostní a chrupavčité tkáně, regenerace.....	29
4.3	Oprava nervové a mozkové tkáně	29

5	Nanovláknenné substráty	30
5.1	Nanovláknenné substráty tvořené oxidem křemičitým.....	30
6	Experimentální část.....	32
6.1	Použité materiály a chemikálie	32
6.2	Použité metody	33
6.2.1	Silylace křemičitých nanovláken.....	33
6.2.2	Kvantifikace vázaných aminoskupin	34
6.2.3	Metody charakterizace křemičitých nanovláken.....	35
6.2.4	Imobilizace kyseliny hyaluronové.....	36
6.2.5	Kvantitativní stanovení HA na povrchu SiO ₂ nanovláken	37
7	Výsledky měření a diskuze	39
7.1	Morfologie čistých křemičitých nanovláken	39
7.2	Fluorescenční stanovení koncentrace aminoskupin.....	40
7.2.1	Morfologie křemičitých nanovláken po silylaci	43
7.2.2	Optimální podmínky silylační reakce.....	47
7.3	Kvantitativní stanovení imobilizované HA	48
7.3.1	Morfologie křemičitých nanovláken po imobilizaci	49
	Závěr	52
	Seznam použité literatury	53
	Příloha A.....	57
	Příloha B	58
	Příloha C	60

Seznam použitých termínů a zkratek

APTES	3-aminopropyltriethoxysilan
BDDE	1,4-butandiol diglycidyl ether
CHO	aldehydová funkční skupina
CMPI	2-chlor-1-methylpiridin jodid
BrCN	bromkyan
CO–NH–NH ₂	hydrazidová funkční skupina
COOH	karboxylová funkční skupina
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DVS	divinyl sulfon
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid
FITC	fluorescein-isothiokyanát
FTIR	infračervená spektroskopie
GAG	glykosaminoglykan
HA	kyselina hyaluronová
NH ₂	aminová funkční skupina
NHS	N-hydroxysukcinimid
NMM	N-methylmorfolin
HOBt	hydroxybenzotriazol
NPs	koloidní částice, nanočástice
OH	hydroxylová funkční skupina
PEDGA	polyethylen glykol akrylát
PEO	olyethylenglykol
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
SiO ₂ -APTES-HA	křemičitá nanovlákná po imobilizaci kyseliny hyaluronové
<i>S. equi</i>	bakterie rodu <i>Streptococcus equi</i>
<i>S. zooepidemis</i>	bakterie rodu <i>Streptococcus zooepidemis</i>
TBA	tetrabutylamonium
TIPS	fázová separace indukovaná teplem
UV	ultrafialové záření

Úvod

Kyselina hyaluronová je přírodní polysacharid, který představuje medicínsky velice zajímavý materiál, významný především pro oblast hojení ran. Obtížná zvláknitelnost v důsledku vysoké molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové však významně limituje možnosti jejího zpracování do nanovláknenných struktur. Jednou z možností získání nanovláknenné struktury s obsahem kyseliny hyaluronové je její imobilizace na povrch nanovláken, kdy testovaným nanovláknenným substrátem je substrát na bázi oxidu křemičitého.

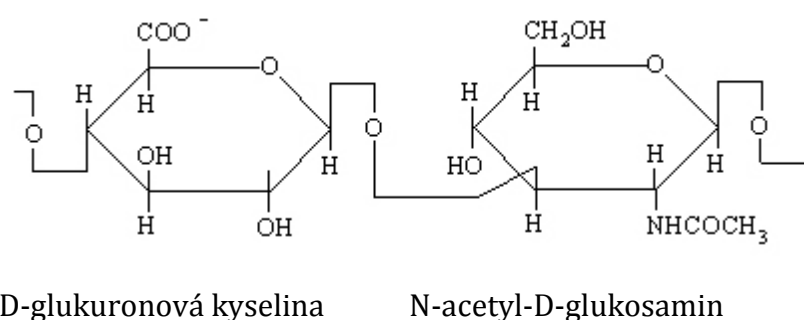
Křemičitá nanovláknna jsou unikátním materiálem zajímavý především pro aplikace v medicíně, kde mohou být tato vlákna využívána jako nosiče pro účinné látky, enzymy apod., které nemají dostatečnou stabilitu a bez jejich imobilizace by bylo jejich použití velmi obtížné či nemožné. Výhodou křemičitých materiálů je jejich univerzálnost, dobrá mechanická stabilita, velký specifický povrch a zdravotní nezávadnost.

1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (HA) je přírodní polysacharid patřící do skupiny mukopolysacharidů neboli též glykosaminoglykanů (GAG), což jsou látky, jejichž řetězce jsou lineární. Jejich typickým znakem je struktura tvořená z opakujících se disacharidických jednotek. V případě kyseliny hyaluronové se opakující disacharidická jednotka skládá z monosacharidu kyseliny glukuronové a monosacharidu N-acetylglukosaminu. Tyto monosacharidy jsou mezi sebou spojeny glykosidickou vazbou β 1-3. Jednotlivé disacharidické jednotky jsou pospojovány v polymer s vysokým polymeračním stupněm glykosidickými vazbami β 1-4. Tato kyselina se vyskytuje u obratlovců prakticky ve všech tkáních a vzhledem k tomu, že se tato látka v organismu povětšinou nachází jako sodná nebo jiná sůl, prosazuje se označení *hyaluronan*.

1.1 Chemická struktura

Po chemické stránce je hyaluronan negativně nabitý, lineární GAG tvořený opakující se disacharidickou jednotkou složenou z β (1,3)-D-glukuronové kyseliny a β (1,4)-N-acetyl-D-glukosaminu. Molární hmotnost řetězců HA se pohybuje v rozmezí $1 - 8 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, přičemž nejčastější molární hmotnost je $2 - 5 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ [1] [2].



Obrázek 1: Chemická struktura kyseliny hyaluronové [3]

Hyaluronan tvoří intramolekulární vodíkové vazby a vyskytuje se buď jako volný řetězec, nebo je kovalentně vázán na proteiny. HA se od ostatních glykosaminoglykanů liší hlavně tím, že se neváže na proteinové jádro, neobsahuje sulfátovou skupinu a dále se liší také extrémní délkou molekul [4].

1.2 Vlastnosti kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je důležitou složkou extracelulární matrix (ECM) a je přítomna všude tam, kde je potřeba udržovat vlhkost mezi vrstvami tkáně nebo zabránit nežádoucímu tření. HA má unikátní sadu vlastností, mezi které patří především hydrofilita, lubricita a vlastnosti reologické. Kromě těchto vlastností se HA také projevuje jako signální molekula účastnící se imunologických procesů a ovlivňuje mobilitu a adhezi buněk v rámci jejich proliferace a diferenciace. Dále má významné antioxidační vlastnosti a působí jako vychytávač volných radikálů [1] [5].

1.2.1 Hydrofilita

Ze struktury uvedené v kapitole 1.1 je patrné, že se jedná o polymer, který je díky existenci velkého množství hydroxylových skupin (OH) ve své struktuře schopen vázat velké množství vody a který je ve vodě poměrně dobře rozpustný díky nábojové repulsi vyvolané karboxylovými skupinami (COOH). Studium úhlové závislosti rozptylu světla vedlo k závěru, že molekuly HA vytváří v roztoku strukturu, která připomíná tuhá klubka, a tato klubka jsou schopna zadržet dokonce až tisíckrát větší množství vody, než je vlastní hmotnost HA. Hydrofilní charakter HA usnadňuje její interakci s různými tkáněmi. [3] [5].

1.2.2 Vlastnosti reologické

Lineární polymerní řetězce kyseliny hyaluronové zaujímají v roztoku tvar klubka, ve kterém se tyto řetězce vzájemně spojují již při malých koncentracích, což přispívá k jejím neobvyklým reologickým vlastnostem. Při vyšších koncentracích vykazují roztoky HA extrémně vysokou, ale na smykové rychlosti závislou viskozitu. Roztok o koncentraci 1 % vypadá jako gel, avšak pokud na něj působíme tlakem, snadno se pohybuje a může být aplikován i velmi tenkou injekční jehlou. Z hlediska reologie se tedy HA chová jako pseudoplastický materiál [3] [5].

1.2.3 Lubricita

Mimořádné reologické vlastnosti roztoků obsahujících HA, které jsou popsány v předchozí kapitole, z nich dělají ideální lubrikační materiál. Je dokázáno,

že HA odděluje většinu tkáňových ploch, které se po sobě navzájem posouvají. Dále bylo také prokázáno, že extrémní lubrikační vlastnosti HA snižují pooperační adheze a to především po břišní a ortopedické chirurgii [3] [5].

1.2.4 Komerční dostupnost

Z hlediska dostupnosti a přijatelnosti pro organismus je ideálním materiálem právě skupina glykosaminoglykanů existujících v živočišných tkáních. Všichni tito zástupci, kam patří i kyselina hyaluronová, jsou prakticky nemutagení, neimunogenní a netoxické látky. Ovšem jejich průmyslové získávání, až na HA, představuje velký problém, protože je možné je získat pouze ze živočišných tkání, kde se sice tyto látky vyskytují, avšak ve velmi malém, průmyslově využitelném, množství. Navíc jejich čistota není dostatečně vysoká v důsledku obsahu určitého množství imunogenních bílkovin. Jedinou výjimkou je právě HA, kterou lze vyrábět v dostatečném množství a přitom ve vysoké čistotě biotechnologicky z určitých druhů kultivovaných bakterií. Tyto mikroorganismy jsou přirozeně obaleny kapsulou, která je tvořena čistou HA [6].

Kromě těchto klasických zdrojů pro izolaci HA patří k dalšímu způsobu získávání HA také izolace z kohoutích hřebínků. Jedna společnost, Pharmacia AB (Uppsala, Švédsko), vyvinula speciální kmen kohoutů s velmi bujnými hřebeny, ze kterých se sloučenina izoluje. Komerčně dostupný materiál se dodává v molekulové hmotnosti v rozmezí $1 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ – $8 \cdot 10^6 \text{ g.mol}^{-1}$ [5].

1.3 Výskyt a funkce kyseliny hyaluronové

HA se vyskytuje prakticky ve všech tkáních obratlovců, a to ve dvou podobách. Jednak vázaná elektrostatickými a kovalentními silami k dalším molekulám ECM a jednak volná jako humektant (kůže), lubrikant (klouby) či látka udržující stálý tvar (oční bulva) nebo jako výplňová složka některých orgánů (pupeční šňůra). Téměř polovina HA v těle se nachází v kůži s největším zastoupením v intracelulárním prostoru, kde jí může být až 2,5 g/l [7]. Bohužel má HA poločas rozpadu kratší než 3 dny, a proto je nutné, aby tělo neustále HA doplňovalo. Změny v koncentraci HA jsou pozorovány při stárnutí, hojení ran a degenerativních onemocněních [8]. Přehled koncentrace kyseliny hyaluronové v živočišných tkáních a tekutinách je zaznamenán v níže uvedené Tabulka 1.

Aktivita HA je silně závislá na molekulové hmotnosti. Obecně platí, že HA s vysokou molekulovou hmotností nejeví prakticky žádnou biologickou aktivitu ve smyslu regulace pochodů v organismu nebo regulace buněk a její funkce je spíše organizační. Ovšem HA s velmi nízkou molekulovou hmotností (tedy s molekulovou hmotností pod $5 \cdot 10^5 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) má vliv na různé pochody v tkáních a buňkách, přičemž bylo dokázáno, že čím nižší je molekulová hmotnost hyaluronanu, tím větší je jeho biologická aktivita [6].

Kyselina hyaluronová má také spoustu dalších funkcí. Je důležitým hydratačním médiem, klíčem k embryonálnímu vývoji a především se podílí na obnovení tkání a regeneraci. Molekuly HA mají další velmi specifické funkce, mezi které patří i účast na angiogenezi. Dále se tyto molekuly podílejí na podpoře hojení ran [9].

Výskyt HA není typický pouze pro obratlovce. Jak je již zmíněno v kapitole 1.2.4, HA je součástí pouzder některých bakterií, např. některých kmenů streptokoků (*S. zooepidemicus*, *S. equi*, atd.) [7] [9].

Tabulka 1: Koncentrace HA v živočišných tkáních a tekutinách [7]

Tkáň nebo tělní tekutina	Koncentrace [µg/ml]	Poznámky
Kohoutí hřebínek	7500	živočišná tkáň s nejvyšším obsahem HA
Lidská pupeční šňůra	4100	tkáň s relativně vysokou molekulovou hmotností HA
Lidská synoviální tekutina	1400–3600	při zánětu dochází k poklesu koncentrace HA v důsledku zvětšení objemu synoviální tekutiny
Hovězí nosní chrupavka	1200	často se užívá jako model chrupavky v experimentálních studiích
Sklivec lidského oka	140–340	při zrání této tkáně dochází ke zvýšení koncentrace HA
Dermis	200–500	zde je HA navržena jako omlazující prostředek v kosmetické dermatologii
Epidermis	100	koncentrace HA je vyšší kolem syntetizovaných buněk
Králičí mozek	65	–
Králičí srdce	27	–
Lidská hrudní lymfa	0,2–50	malá molární hmotnost HA je vysvětlena přednostní absorpcí větších molekul buňkami jater
Lidská moč	0,1–0,3	je zdrojem enzymu <i>hyaluronidázy</i>
Krevní plazma	0,01–0,1	u starších lidí, pacientů s artritidou nebo cirhózou jater je koncentrace HA vyšší

1.3.1 Kyselina hyaluronová v kůži

HA plní řadu důležitých funkcí v kůži, ke kterým patří zadržování vody ve tkáních. Tím dochází ke změně dermálního objemu a stlačitelnosti, což může ovlivnit buněčnou proliferaci a diferenciaci. Dále působí v kůži jako „zachycovač“ volných radikálů, které jsou generovány UV zářením ze slunce. UV světlo způsobuje oxidační procesy na buňkách a může tak dojít k poškození jejich genetického materiálu, což by mohlo způsobit degeneraci a smrt [7].

1.3.2 Kyselina hyaluronová v synoviální tekutině a kloubech

HA se nachází ve všech kostech a chrupavčitých strukturách v celém těle. V kloubech, i přes relativně nízký obsah, funguje HA jako důležitý konstrukční prvek matrice tvořící agregační centrum pro aggregan. V synoviální tekutině poskytují vysoké koncentrace vysokomolekulární HA mazání pro klouby. Dále

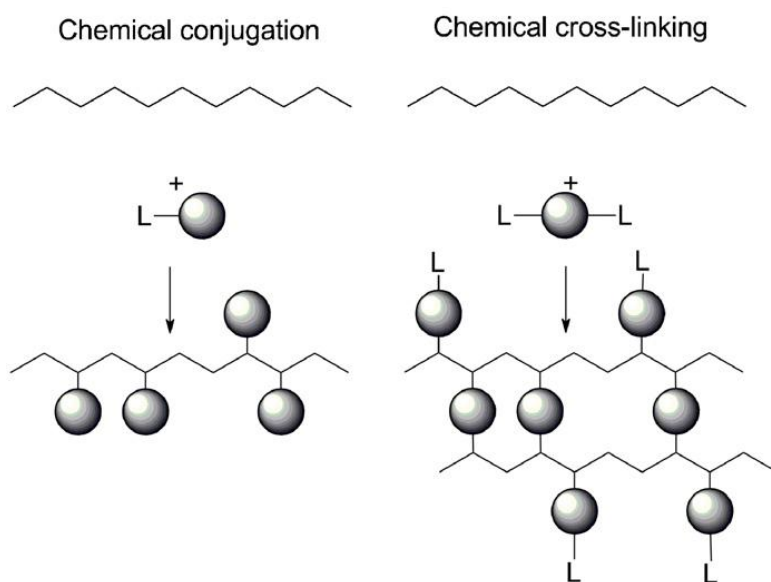
slouží jako tlumič nárazů, snižuje tření kostí a zmenšuje opotřebení kloubů. Při zánětlivých artritických stavech, jako je např. osteoartritida nebo revmatoidní artritida, dochází k degradaci vysokomolekulární HA reaktivními kyslíkovými sloučeninami, které snižují její viskozitu a poškozují tak lubrikační a tlumivé vlastnosti, což vede ke zhoršení pohyblivosti kloubů a bolestivosti [7] [8].

1.3.3 Kyselina hyaluronová v extracelulární matrix

HA hraje v ECM několik důležitých rolí díky schopnosti interakce s buňkami, které jsou pevně zakotveny v ECM. Jedna z nejdůležitějších interakcí je interakce mezi HA a receptorem CD44, který zprostředkovávají buňky, a který se nachází na povrchu většiny buněk. Jedná se o receptor bílkovinné povahy, který pomáhá regulovat pochody odehrávající se v buňce a to právě přes interakce s jeho ligandem, tedy kyselinou hyaluronovou. Změny v expresi tohoto receptoru jsou spojovány s celou řadou nádorových onemocnění, což způsobuje velký zájem o tento receptor kyseliny hyaluronové. Zdá se, že zvýšená exprese CD44 podporuje vazbu HA, což u některých tumorů souvisí s vyšší tendencí metastáz [6] [10].

2 Modifikace kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová může být chemicky modifikována dvěma různými způsoby: sítováním nebo konjugací. Tyto dvě metody, jejichž mechanismy jsou znázorněny na Obrázek 2, jsou založeny na stejné chemické reakci a odlišují se tím, že v případě konjugace dochází k navázání sloučeniny na řetězec HA pouze jednou vazbou, kdežto v případě sítování jsou odlišné řetězce HA spojeny dvěma či více vazbami, což zajišťuje stabilitu výsledného derivátu. Kromě toho, existují různé typy sítovacích postupů: přímé sítování, sítování derivátů HA a sítování různých derivátů HA. Pro sítování nebo konjugaci HA existuje řada metod, kdy některé vyžadují přítomnost vody, jiné zase přítomnost organického rozpouštědla v důsledku citlivosti molekuly na hydrolýzu.



Obrázek 2: Konjugace a sítování polymeru [11]

Chemická modifikace HA může být provedena na dvou možných funkčních skupinách HA a to na karboxylové (COOH) nebo hydroxylové (OH).

2.1 Modifikace karboxylové funkční skupiny (COOH)

2.1.1 Amidace

Amidace je jednou z možných modifikací karboxylové funkční skupiny HA. Princip všech těchto reakcí je stejný a liší se pouze v druhu vybraného aktivačního činidla, rozpouštědla a podmínkách reakce, mezi které patří především hodnota

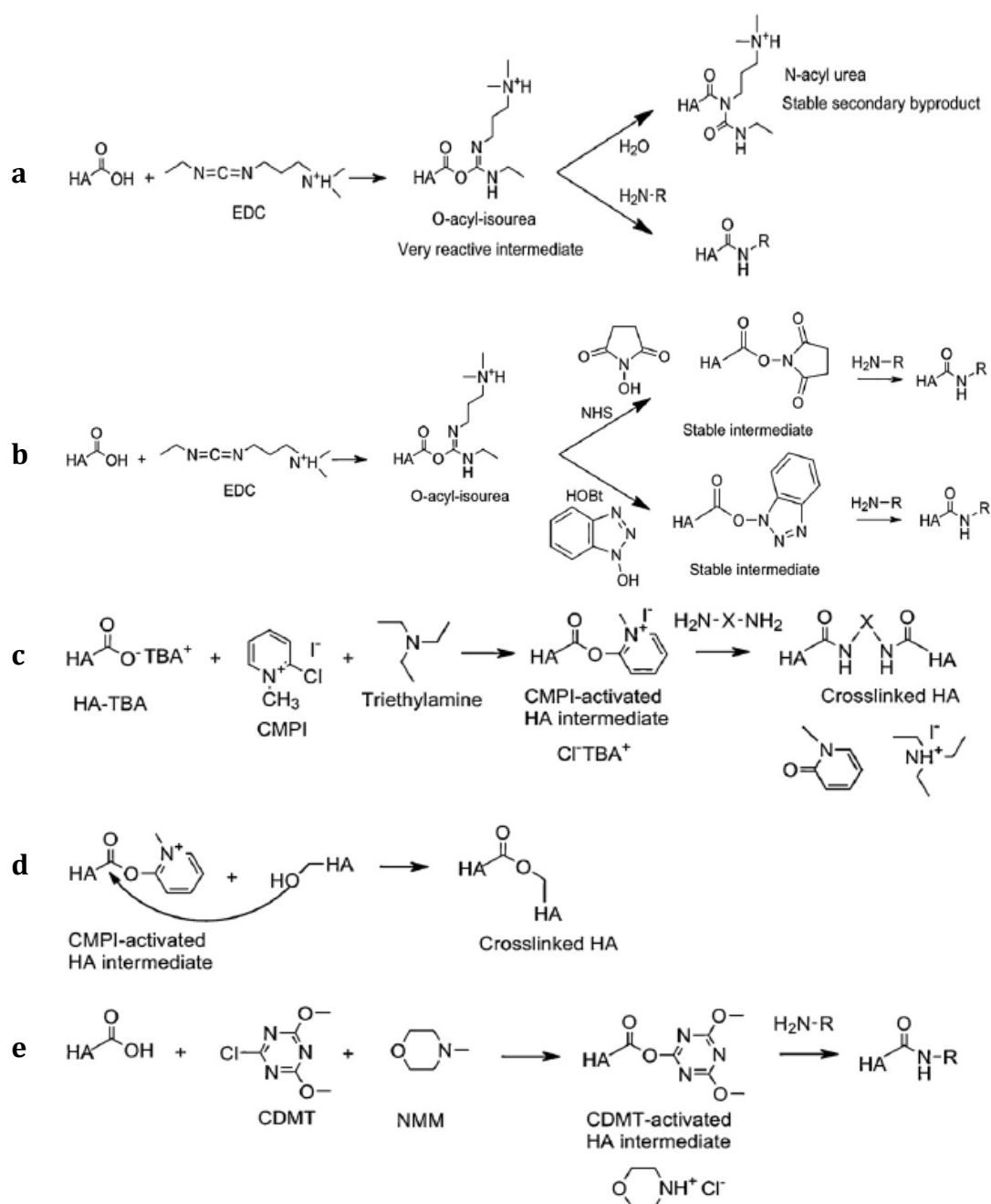
pH. Prvním krokem amidační reakce je aktivace COOH skupiny HA pomocí síťovacího činidla, při kterém dochází ke vzniku meziproduktu. Tento meziprodukt posléze podléhá nukleofilnímu ataku aminu a vzniká tak finální produkt ve formě derivátu HA.

Jak je již výše zmíněno, existuje celá řada amidačních reakcí, které vedou k produkci derivátů HA. Jednou z nejčastěji používaných metod modifikace HA, kterou se ve svých člancích zabývají Prestwich a kol. [12] a Bulpitt a Aeschlimann [13], je amidace pomocí karbodiimidů, kde využívají EDC jako síťovacího činidla. EDC aktivuje molekulu COOH za vzniku nestabilního meziproduktu O-acyl isomočoviny, který ihned reaguje s vodou a vzniká tak N-acyl močovina jako vedlejší produkt, čímž se zabrání reakci s aminem. K tomu, aby se zabránilo vzniku N-acyl močoviny jako nevratného produktu, je zde potřeba použít sloučeninu NHS nebo HOBt, která zabraňuje hydrolýze. Výhodou EDC je jeho rozpustnost ve vodě a interakce se sodnou solí HA, což vede k udržení molekulové hmotnosti HA a tedy k zachování jejích viskoelastických vlastností.

Magnani a kol. [14] se taktéž ve své práci zabývají chemickou modifikací HA, kde využívají 2-chlor-1-methylpyridin jodid (CMPI) jako aktivační činidlo. Zásadní rozdíl oproti amidaci karbodiimidy je ten, že tato reakce probíhá v organickém rozpouštědle DMF, aby se minimalizovala hydrolýza CMPI. V důsledku nerozpustnosti sodné soli HA v organických rozpouštědlech je sodná sůl HA převedena na sůl TBA. Dále je při této reakci využit triethylamin jako neutralizační prvek jodidových aniontů. Pokud při této reakci není přítomen amin, dochází k tzv. samozesíťování, což znamená, že pyridinový meziprodukt reaguje s vlastním hydroxylem za vzniku esteru.

Bergman a kol. [15] popsali novou metodu amidace HA užitím 2-chlordimethoxy-1,3,5-triazinu (CDMT) jako aktivačního činidla COOH skupin. Tato reakce probíhá ve směsi voda:acetonitril v poměru 3:2 a za přítomnosti NMM, který neutralizuje chloridové anionty.

Všechny výše uvedené reakční mechanismy amidací jsou zobrazeny v níže uvedeném Obrázek 3.



Obrázek 3: Amidační reakce za použití samotného EDC (a), EDC/NHS a EDC/HOBT (b), CMPI s aminem (c), samotné CMPI (d), CDMT/NMM (e) [11]

2.1.2 Esterifikace

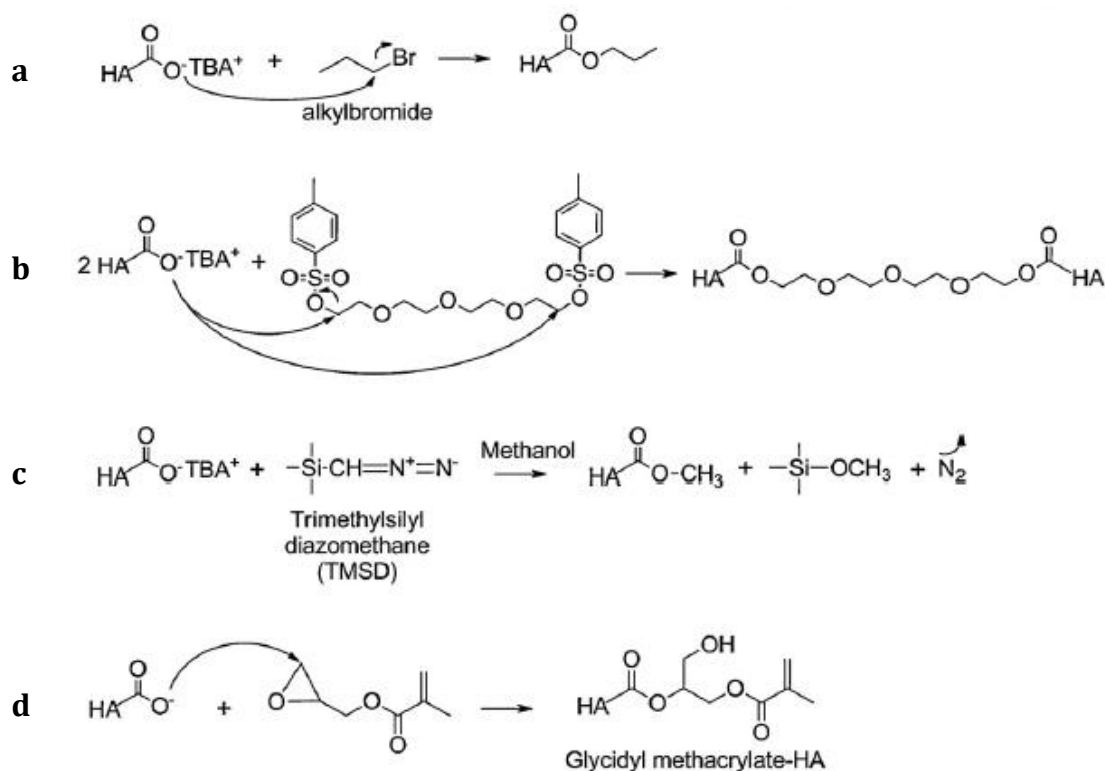
Esterifikace je taktéž jednou z nejčastějších modifikací karboxylové funkční skupiny HA. Mechanismy všech esterifikačních reakcí jsou opět stejné, tudíž výsledným produktem je ester HA.

Společným faktorem většiny esterifikačních reakcí je organické rozpouštědlo DMSO, ve kterém dané reakce probíhají. Výjimku tvoří esterifikační reakce užívající epoxidů jako síťovacích činidel, kdy rozpouštědlem je zde voda.

S tím také souvisí převedení sodné soli HA na TBA sůl, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.1. Nejjednodušším postupem tvorby esterů HA, patentovaným vědci Della Valle a Romeo [16], je alkylace alkylhalogenidů, kdy nejčastěji je využito alkyljodidů a alkylbromidů. Huin-Amargier a kol. [17] využívají esterifikace HA pomocí tetraethylen glykolu, který je funkcionalizován dvěma skupinami tosylátu. Za zmínku stojí i esterifikace HA využívající diazomethanu, kterou popisují Hirano a kol. [18].

K esterifikaci HA jsou využívány i epoxidy, jako např. glycidyl methakrylát, které primárně reagují s COOH skupinou HA. Ovšem epoxidy mohou interagovat i s OH skupinami HA za vzniku tzv. trans-esterifikace, což je reversibilní děj podrobně popsáný v článku Bencherif a kol. [19].

Všechny výše uvedené reakční mechanismy esterifikací jsou zobrazeny v níže uvedeném Obrázek 4.



Obrázek 4: Esterifikační reakce za použití alkylhalogenidů (a), tetraethylen glykolu ditosylátu (b), diazomethanu (c), glycidyl methakrylátu (d) [11]

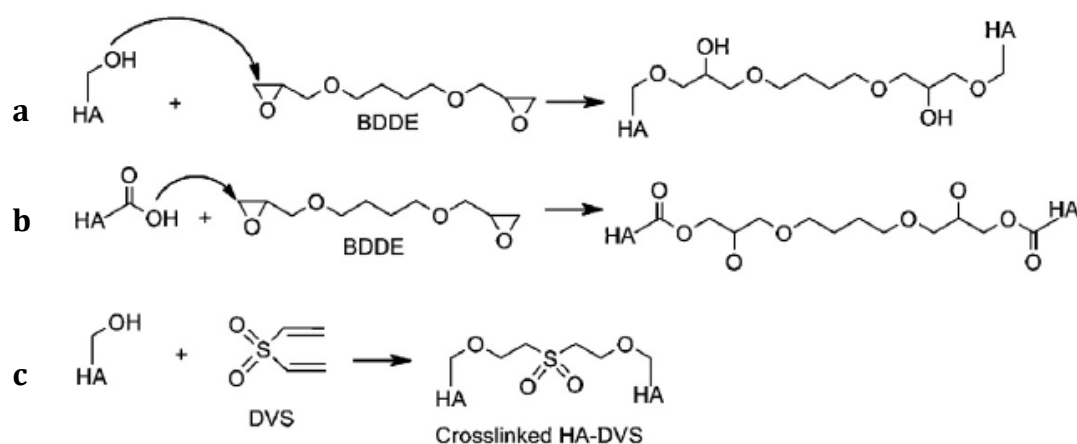
2.2 Modifikace hydroxylové funkční skupiny (OH)

2.2.1 Tvorba etherů

Existuje celá řada reakcí vedoucích ke tvorbě etherů HA, z nichž nejvýznamnější je tvorba etherů HA pomocí epoxidů a pomocí DVS (Obrázek 5).

Podstatou reakcí využívajících epoxidů je otevření epoxidového kruhu za vzniku etherové vazby s molekulou OH. Etherová vazba však může vznikat i na COOH skupině HA, jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.2. Důležitým faktorem vzniku etherové vazby je pH. Pokud je HA vystavena vysokým hodnotám pH ($\text{pH} > 13$), které jsou vyšší než hodnoty pK_a OH skupin, pak dochází k deprotonaci skoro všech OH skupin nacházejících se na HA a tedy reakce přednostně probíhají na OH skupinách HA. V opačném případě dochází ke vzniku esterové vazby s COOH skupinou HA. Nejvíce využívaným síťovacím činidlem z řady epoxidů je 1,2,3,4-diepoxybutan nebo BDDE [11].

Balazs a Leschiner [20] využívají DVS jako síťovacího činidla, přičemž dochází k vytvoření sulfonyl bis-ethylových vazeb mezi OH skupinami HA. Výhoda této metody je v rychlosti reakce, která se spustí během 5 minut po přidání DVS a ukončí se během 1 hodiny. I přesto, že je výchozí látka vysoce reaktivní a karcinogenní, vzniklý derivát HA ve formě hydrogelu je biokompatibilní.

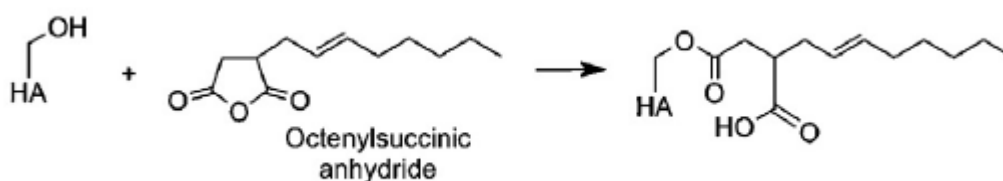


Obrázek 5: Tvorba etherů pomocí BDDE při zásaditém pH (a), při kyselém pH (b) a pomocí DVS (c) [11]

2.2.2 Esterifikace

Další možnou modifikací COOH skupiny HA je úprava prostřednictvím esterů. Často využívanými aktivačními činidly jsou anhydridy kyselin, jako např. alkyl anhydrid kyseliny jantarové či anhydrid kyseliny methakrylové.

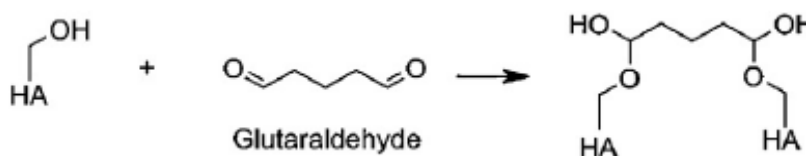
Užití alkyl anhydridu kyseliny jantarové (Obrázek 6) jako modifikačního činidla popisují Toemmeraas a Enschooten [21] a užití anhydridu kyseliny methakrylové popisují Smeds a Grinstaff [22]. Obě reakce probíhají ve vodném prostředí a to při zásaditém pH. Navíc methakrylová skupina obsažená v anhydridu kyseliny methakrylové umožňuje fotosíťování derivátů HA.



Obrázek 6: Esterifikační reakce pomocí alkyl anhydridu kyseliny jantarové [11]

2.2.3 Síťování pomocí glutaraldehydu (GTA)

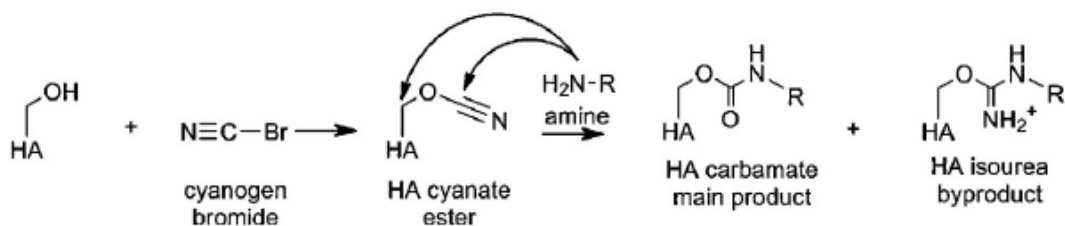
Modifikací HA za přítomnosti GTA vznikají hemiacetálové vazby mezi OH skupinami HA (Obrázek 7). Celá reakce probíhá ve směsném rozpouštědle skládajícím se z vody a acetonu. Při použití GTA jako síťovacího prvku byla vyzkoušena i směs vody s ethanolem. Ovšem při této kombinaci došlo k inhibici síťovací reakce, což je způsobené navázáním ethanolu na OH skupinu HA. Hlavní nevýhodou této metody je toxicita GTA, a tudíž je potřeba důkladné čištění konečného produktu [11] [23] [25].



Obrázek 7: Tvorba hemiacetálu pomocí GTA [11]

2.2.4 Tvorba karbamátů

Tato reakce je založena na využití BrCN jako aktivátoru OH skupin. Vznikající kyanát esteru HA interaguje s aminem za vzniku karbamátového hlavního produktu a jako vedlejší produkt je zde přítomna HA-isomočovina (Obrázek 8). Jelikož tato reakce probíhá ve vodném prostředí, není potřeba upravovat výchozí látku, kterou je sodná sůl HA [24].



Obrázek 8: Tvorba karbamátů za pomoci CNBr [11]

3 Biomateriály na bázi kyseliny hyaluronové

I když se kyselina hyaluronová v tkáních vyskytuje převážně v polymerní podobě s vysokou molekulovou hmotností, je v této podobě ve tkáňovém inženýrství prakticky nepoužitelná, a to zejména pro svou dobrou rozpustnost ve vodě, snadnou biodegradovatelnost a nevhodné mechanické vlastnosti. Je tedy potřeba sáhnout k chemickým modifikacím, které z nativního biopolymeru vytvoří materiál vhodný pro tkáňové inženýrství. Vlastnosti těchto biomateriálů se mohou výrazně lišit od nativního polymeru, ovšem většinou si zachovávají biodegradabilitu a biokompatibilitu, stejně jako nativní polymer. Na základě rozdílných velikostí těchto biomateriálů je lze obecně rozdělit na nanomateriály a makroskopické útvary, tzv. hydrogely.

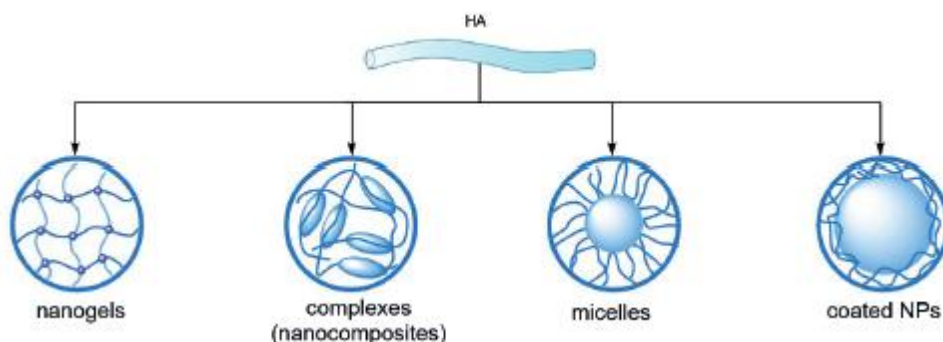
3.1 Nanomateriály HA

Mezi nanomateriály na bázi HA patří především koloidní částice (NPs) s průměrem menším než je 1 μm , které vznikají stabilizací derivátů HA pomocí síťovacích činidel. NPs mohou být síťovány kovalentně, tedy chemickou vazbou (nanogely) nebo nekovalentně, jako např. elektrostaticky, iontově či pomocí vodíkových můstků (nanokompozity, pevné koloidní částice potažené HA). Metody vybrané pro přípravu NPs jsou silně závislé na rozpustnosti výchozích látek. Nejvíce využívanou metodou přípravy NPs HA je inverzní emulgace. Principem emulgačního síťování je reakce, která nastává ve vodných kapkách HA nebo jejím derivátu. Tyto deriváty jsou rozprostřeny v organické fázi společně se surfaktantem, který je v této fázi rozpustný. Jedná se o emulzi typu "voda v oleji" a rychlost této reakce ovlivňuje velikost vzniklých NPs [26]. Nevýhodou emulgačních metod je užití ultrazvuku, což může nepříznivě ovlivňovat biologické molekuly, které mohou být enkapsulovány např. v nanogelech.

V závislosti na vnitřní struktuře jsou rozlišovány 4 typy NPs na bázi HA: nanogely, nanokompozity, micely a pevné koloidní částice pokryté HA. Všechny tyto struktury jsou zobrazeny v níže uvedeném Obrázek 9.

Nanogely jsou útvary, které vznikají propojením dlouhých řetězců HA s náhodně orientovanými hydrofobními skupinami. Jedná se o unikátní materiál, který rapidně nepodléhá degradaci v těle. V důsledku přítomnosti HA, která je

schopna absorbovat velké množství vody, mohou být nanogely považovány za hydrogely ovšem s rozdílnou velikostí. Nanogely společně s nanokompozity mají tu výhodu, že mohou ve své struktuře obsahovat ještě jiné anorganické nanočástice v závislosti na jejich poréznosti, na rozdíl od samotných anorganických NPs potažených HA [27].



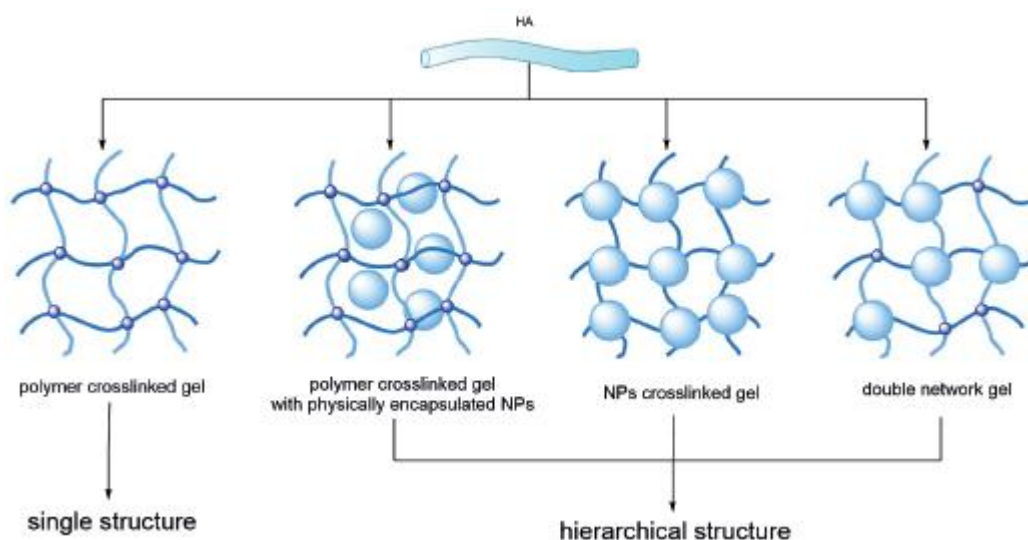
Obrázek 9: Strukturní klasifikace NPs na bázi HA [27]

3.2 Hydrogely na bázi HA

Za hydrogely na bázi HA jsou považovány 3D struktury, které vznikají náhodným síťováním a obsahují velké množství vody. Dominantou těchto materiálů je právě robustnost a větší odolnost vůči enzymatické degradaci, kdy tato vlastnost je stejná i pro výše definované nanogely. Stejná je i příprava hydrogelových materiálů, tedy kovalentním či nekovalentním síťováním, kdy právě kovalentní síťování je hojně využíváno v medicíně. Jednou z hojně využívaných aplikací hydrogelů v medicíně jsou injekce, jejichž cílem je tvorba hydrogelu *in situ* (v místě působení) mísením dvou polymerních derivátů a to za krátkou dobu. Většinou se jedná o dva deriváty obsahující hydrazidovou (CO-NH-NH_2) a aldehydovou (CHO) skupinu [28] [29]. Nevýhodou kovalentního síťování je toxicita činidel a drsné podmínky, které nejsou vhodné pro enkapsulaci buněk. Je tedy třeba vyselektovat chemismus syntézy hydrogelů HA tak, aby nedocházelo k vytváření vedlejších toxických produktů nebo k vážné degradaci HA [26] [27].

Na základě vnitřní struktury hydrogelů je lze obecně rozdělit na hydrogely s jednoduchou strukturou a hydrogely, jejichž struktura je hierarchicky uspořádána. Možnosti hierarchicky uspořádané strukturu společně s jednoduchou strukturou jsou znázorněny na Obrázek 10.

Struktura hydrogelů vykazuje vysokou poréznost, která je účinná pro zachycení NPs, čímž dochází k vyztužení těchto materiálů a tedy ke zlepšení jejich mechanických vlastností. Z výše uvedeného obrázku je patrné, že hierarchicky strukturované materiály mohou vznikat kovalentním navázáním NPs na polymerní matici, síťováním NPs polymerním řetězcem nebo dvojítm síťováním [27].



Obrázek 10: Strukturní klasifikace hydrogelů na bázi HA [27]

3.3 Metody zpracování biomateriálů

Existuje celá řada metod, kterými lze biomateriály na bázi HA zpracovávat. Nicméně v této práci jsou popsány pouze běžně používané techniky.

3.3.1 Fázová separace

Fázová separace je druh techniky, pomocí které lze připravit především porózní hydrogely a nanovláknenné substráty. Fázová separace polymerního roztoku může být indukována několika způsoby. Prvním z nich je separace fází bez rozpouštědla, dále pak chemicky indukovaná fázová separace a tepelně indukovaná fázová separace (TIPS). TIPS je relativně novou metodou, při které dochází k tvorbě porézního materiálu vlivem snížení teploty. Jakmile je poté z dané fáze odstraněno rozpouštědlo, např. extrakcí či odpařením, dochází ke ztuhnutí daného polymeru a v místech, ve kterých bylo rozpouštědlo, vzniknou póry, jejichž velikost je závislá na koncentraci polymerního roztoku, rozpouštědla a teplotě fázové separace [30] [31].

3.3.2 Bioprinting

Principem technologie bioprintingu je zhotovení 3D struktury, která vzniká na základě skládání jednotlivých buněčných vrstev a biomateriálů. Toto skládání je precizně řízeno robotickým přístrojem, díky kterému jsou tyto struktury využívány jako funkční tkáně. Velkým omezením bioprintingu je dostupnost biomateriálů, které musí být vytlačovatelné, cytokompatibilní, robustní, biologicky rozložitelné a kompatibilní s tiskovým zařízením [32] [33].

Nejvíce využívaným biomateriálem v oblasti bioprintingu je thiolovaná HA společně s deriváty želatiny. Tyto dva deriváty byly podrobeny síťovací reakci, kdy síťovacím činidlem zde byl polyethylen glykol tetraakrylát. Po přidání určité koncentrace buněk byl finálním produktem hydrogel, který byl tištěn ve formě makroskopických vláken a tato vlákna prokázala životaschopnost po dobu 4 týdnů [34].

3.3.3 Electrospinning

Electrospinning neboli elektrostatické zvlákňování je unikátní proces výroby ultratenkých vláken s průměry od submikronů do nanometrů. Výhodou těchto vláken je jejich vysoce specifický povrch a vysoká pórovitost, která je ovšem špatně kontrolovatelná [35].

I při téhle metodě byla využita thiolovaná HA, která byla nejprve zesítněna přítomností činidla PEDGA a poté zvlákněna za vzniku 3D nanovláknenné struktury. Při síťování byl použit PEO jako modifikátor viskozity usnadňující formování 3D struktury. Na tento nanovláknenný substrát byl adsorbován fibronectin, což je glykoprotein usnadňující migraci fibroblastů [36].

3.3.4 Odstředivé lití

Metoda odstředivého lití využívá odstředivých sil vznikajících při rotaci k vytváření 3D struktur trubicovitých tvarů. Tyto trubicovité struktury jsou tvořeny hydrogelem skládajícím se z thiolované HA a želatiny, ve kterém jsou enkapsulovány buňky. Hydrogel tvořený thiolovanou HA a želatinou vytváří syntetický ECM. Využití této metody je široké, od kapilár přes cévy až dokonce k planárním strukturám [37].

3.3.5 Lyofilizace

Lyofilizace je proces vysoušení hydrogelu mrazem za přítomnosti porogenu, látky, která má specifický tvar a velikost, a která se používá k tvarování struktur pomocí pórů. Jakmile je daný hydrogel zmražen, nastává sublimační proces ve vakuu, pomocí kterého je odstraněn porogen a tím vzniká porézní strukturní síť. Výhodou této metody je kontrola velikosti pórů pomocí nastavení mrazicí teploty [38].

4 Aplikace biomateriálů na bázi HA v medicíně

4.1 Výplně prostoru a hojení ran

Unikátní vlastnosti těchto biomateriálů, mezi které patří robustnost a bioadhezivita, zaručují jejich využití jako vyplňovače prostoru. Kromě toho, musí hydrogelové materiály splňovat řadu požadavků, jako je schopnost udržení požadovaného objemu nebo zachování strukturální integrity po určitou dobu [25]. Jejich využití v biomedicíně je široké a zahrnuje spoustu oblastí, jako je urologie, kde slouží jako implantáty při léčbě inkontinence moči [39] nebo rekonstrukční chirurgie [40] či kosmetika [41].

Důležitou oblastí v medicíně je hojení ran, kde se tyto materiály používají k léčbě především komplikovaných a těžce se hojících ran [42].

4.2 Oprava kostní a chrupavčité tkáně, regenerace

Jednou z nejdůležitějších vlastností materiálů užívaných k regeneraci kostí a chrupavek je proliferace buněk. Jelikož kyselina hyaluronová výrazně zvyšuje buněčnou proliferaci, jsou tedy biomateriály na bázi HA vhodným kandidátem. Např. lyofilizované deriváty HA společně s chitosanem byly využity k enkapsulaci chondrocytů [43] nebo lyofilizované deriváty HA společně s kyselinou polyglykolovou byly využity k zapouzdření buněk menisků [44].

4.3 Oprava nervové a mozkové tkáně

Unikátní vlastnosti struktur na bázi HA předurčují jejich použitelnost v centrálním nervovém systému jako nosičů buněk využívaných při zotavování po mozkové mrtvici [45]. V těchto aplikacích je využíváno derivátů HA společně s kyselinou polymléčnou, které jsou zpracovány metodou elektrostatického zvlákňování. Vzniklé biomateriály jsou použity jako nosiče buněk lidské kostní dřevě [46] a jelikož mají pozitivní vliv na regeneraci motorické funkce, mohou být taktéž využívány jako nosiče lidských mezenchymálních kmenových buněk [47].

5 Nanovláknenné substráty

Pro termín *nanovlákn* existuje mnoho různých používaných definic. Nanomateriály jsou technicky definovány jako materiály, jejichž rozměry jsou menší než sto nanometrů a to alespoň v jednom směru. Nanovláknna jsou tedy lineární útvary splňující toto tvrzení. Ovšem velmi často je termín *nanovlákn* používán pro všechna vlákna mající průměr menší než 1 μm [48].

Nanovláknenné materiály vykazují celou řadu unikátních vlastností, které jsou spojeny s jejich rozměry, a tudíž jejich využití zasahuje do mnoha oblastí. Mezi tyto oblasti patří např. tkáňové inženýrství, filtrační technologie či elektronika [48].

Výhoda těchto materiálů oproti běžně produkováným materiálům pramení z jejich unikátních vlastností, mezi které patří vysoká porozita, vysoký specifický povrch, lepší mechanické vlastnosti, jako je tuhost či napětí v tahu a především jejich flexibilita k povrchové modifikaci [49].

5.1 Nanovláknenné substráty tvořené oxidem křemičitým

V současné době se v medicínských aplikacích ve většině případů aplikují látky – antibiotika, analgetika, kortikoidy, enzymy, dezinfekční látky apod. přímo *in situ*. Ovšem při těchto aplikacích velmi často dochází ke ztrátám účinné látky z daného místa a to buď vyplavováním tělními tekutinami, nebo odplavováním krevním řečištěm do dalších částí organismu. Průnik léčivých látek do dalších částí organismu, které nesouvisí s daným místem aplikace, je nežádoucí a může vést ke vzniku nežádoucích reakcí v organismu [50].

Z tohoto důvodu je snaha tyto látky imobilizovat na vhodné substráty s cílem zamezit jejich ztrátám z místa aplikace. Důležitá je stabilita vazby mezi substrátem a účinnou látkou, dále pak zachování určité koncentrace dané látky a samozřejmě i zachování funkčnosti dané látky, kterou měla před imobilizací. V současné době jsou křemičitá nanovláknna hojně studována za účelem jejich využití v medicíně v tzv. drug delivery systémech, scaffoldech (lešení, nosič) pro tkáňové inženýrství, membránách pro separaci a dalších aplikacích. Ačkoliv jsou anorganické nanomateriály často kritizovány v důsledku nízké tolerance organismem, studium křemičitých nanomateriálů ukázalo, že jsou tyto materiály

velmi dobře tolerovány a v některých případech dokonce biodegradovány organismem. Důvody pro použití křemičitých nanovláken v biomedicínských aplikacích jsou především tyto:

- Cílené dodání účinných látek do místa určení;
- Proloužení *in vivo* (v živém těle) působení léčiv;
- Zkrácení doby léčení;
- Nízká finanční nákladnost;
- Vynikající snášenlivost organismem – biodegradabilita;

Výhodou křemičitých nanomateriálů jsou široké možnosti modifikace povrchu, které umožňují navázání účinných molekul [50] [51] [52].

Důležitou vlastností křemičitých nanovláknenných substrátů je jejich velký specifický povrch, díky čemuž je možné dosáhnout požadovaných koncentrací účinných látek. Další charakteristickou vlastností je jejich vysoká stabilita při biochemických reakcích, kdy lze regulovat dobu jejich degradace pomocí tepelného zpracování. Jsou rozpustné v tělních tekutinách, kde se tato nanovláknna rozpouštějí na kyselinu křemičitou, která je vyloučena močí během 1 – 2 týdnů. Důležitá je i jejich vynikající smáčivost a především netoxicitá. Navíc křemičitá nanovláknna obsahují na svém povrchu velké množství OH skupin, které lze využít pro jejich modifikaci a navázání účinných látek, viz kapitola 2.2 [53].

6 Experimentální část

Experimentální část této bakalářské práce byla zaměřena na optimalizaci podmínek silylačního procesu křemičitých nanovláknenných substrátů s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu jako modifikačního činidla. Byl zkoumán vliv podmínek silylace na výslednou koncentraci kovalentně navázaných aminoskupin na povrch modifikovaných křemičitých nanovláken. Sledovanými parametry, které ovlivňovaly silylační reakci, byly: doba silylace a koncentrace použitého silylačního činidla.

Druhá část experimentů byla zaměřena na kvantifikaci aminoskupin kovalentně vázaných na povrch křemičitých nanovláken pomocí přístroje Microplate Reader Synergy HTX (BioTek Instruments, USA).

Další část práce se věnovala imobilizaci kyseliny hyaluronové na povrch modifikovaných nanovláken na bázi oxidu křemičitého, která plní funkci nosného substrátu.

V poslední části byly experimenty zaměřeny na kvantifikaci kyseliny hyaluronové, která je pomocí aminoskupin vázána s křemičitými nanovláknennými substráty.

6.1 Použité materiály a chemikálie

- Křemičitá nanovláknna, Si-J32/20-1, J32/20-2, TUL
- Ethanol bezvodý, PENTA
- 3-aminopropyltriethoxysilan (APTES) 98%, Sigma-Aldrich
- Kyselina octová 99%, PENTA
- Kyselina citronová bezvodá, p. a., PENTA
- Kyselina chlorovodíková 35%, PENTA
- Demineralizovaná voda, TUL
- Ultračistá voda, TUL
- Fluorescein isothiokyanát (FITC) isomer $\geq 90\%$, Sigma-Aldrich
- Hydroxid sodný, p. a., PENTA
- Hyaluronan sodný, MW 1,3 MDa, $\rho = 0,143 \text{ g/cm}^3$, obsah proteinu $\leq 0,1 \%$
- Hydrogenfosforečnan disodný dihydrát, p. a., PENTA
- N-hydroxysukcinimid (NHS) 98%, Sigma-Aldrich

- 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) karbodiimid (EDC) \geq 98%, Sigma-Aldrich
- Cetyltrimethylamoniumbromid (CTAB) \geq 99%, Sigma-Aldrich

6.2 Použité metody

6.2.1 Silylace křemičitých nanovláken

Elektrostaticky zvlákněná nanovláknenná vrstva na bázi oxidu křemičitého (o rozměrech 5 x 5 cm a 4 x 3 cm), která byla stabilizována při teplotě 180 °C po dobu 2 hodin, byla vložena do plastové Petriho misky, kam byl následně přidán stanovený objem (20 ml) silylačního roztoku APTES v 96% ethanolu. Silylační roztok byl připraven v plastové kádince, kde byl připraven 96% ethanol jako směs ethanolu a demineralizované vody. Po přidání silylačního činidla APTES bylo před samotnou silylací pomocí roztoku kyseliny octové upraveno pH roztoku na hodnotu 5. Pro optimalizaci silylace byla připravena série roztoků o koncentraci silylačního činidla 2, 3 a 4 %. Silylace byla provedena ve vzduchově utěsněné Petriho misce obsahující křemičitá nanovláknena spolu se silylačním činidlem při současné agitaci na třepačku Heidolph Hei-Tec (Heidolph Instruments, Německo) s rychlostí třepání 50 ot/min. Silylace probíhala při laboratorní teplotě a odběry vzorků probíhaly vždy po 1, 2, 3, 4, 5 hodině.

Po skončení reakce vždy v odpovídající čas byl silylační roztok odtažen pomocí pipety a ke vzorkům bylo přidáno 4 x 20 ml 96% ethanolu za účelem promytí vzorků a odstranění zbylého reakčního činidla z nanovláknenné vrstvy. Vždy poslední 2 promývání probíhala na třepačce při 50 ot/min po dobu 5 minut. Následně byla nanovláknenná vrstva přenesena pomocí pinzety na antiadhezní podložku, na které byla při laboratorní teplotě vysušena. Takto připravené vzorky byly uloženy do vzduchotěsných polyethylenových sáčků, kde byly uchovány pro další použití.



Obrázek 11: Vzorky křemičitých nanovláken (4 x 3 cm) po silylaci 2% roztokem APTES

6.2.2 Kvantifikace vázaných aminoskupin

Stanovení aminoskupin na povrchu křemičitých nanovláknenných substrátů po silylaci bylo provedeno metodou založenou na značení aminoskupin pomocí barvení fluorescein-isothiokyanátem (FITC). Postup celého procesu je uveden níže.

Roztok FITC o koncentraci 136,4 μM použitý k analýze byl připraven zředěním zásobního roztoku FITC o koncentraci 3,41 mM s použitím ethanolu.

Dále byla nanovláknenná vrstva po silylaci o rozměrech 1 x 1 cm vložena do tmavé plastové zkumavky a inkubována s roztokem FITC na třepačce při 50 ot/min po dobu 24 hodin.

Druhý den byl roztok FITC odtažen pomocí pinzety a nanovláknenná vrstva byla promyta 4 x 3 ml ethanolu, přičemž poslední 2 promývání probíhala na třepačce při 50 ot/min po dobu 5 minut. Poté byly ke vzorkům přidány 3 ml 0,2 M roztoku hydroxidu sodného. Uzavřená zkumavka byla umístěna na kývačku po dobu 24 hodin, během kterých došlo k rozpuštění nanovláknenné vrstvy s navázaným FITC.

Následná kvantifikace byla provedena měřením intenzity fluorescence při podmínkách $F_{\text{ex}}/F_{\text{em}}$: 485/528. Z výsledného roztoku, který vznikl rozpuštěním křemičitých nanovláken značených FITC, bylo pro měření na mikrotitrační destičce

použito 200 μL . Pro stanovení intenzity fluorescence stejně jako ke konstrukci kalibrační křivky byl použit přístroj Multiplate Reader Synergy HTX (Obrázek 12).



Obrázek 12: Zařízení pro měření fluorescence - Microplate Reader

6.2.3 Metody charakterizace křemičitých nanovláken

Studium morfologie – skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

Morfologie nanovláknenné vrstvy na bázi oxidu křemičitého byla pozorována pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Tescan Vega 3 (Tescan Orsay Holding, Česká republika) a pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Zeiss Ultra plus (Zeiss, Německo). Použité urychlovací napětí u mikroskopu Tescan Vega 3 (Obrázek 13) bylo 30 kV, kdežto u mikroskopu Zeiss Ultra plus bylo použito 2 a 5 kV. Před vlastní analýzou byly vzorky křemičitých nanovláken potaženy vrstvou zlata o tloušťce cca 6 nm v přístroji Quorum SC7620 (Quorum Technologies, Ashford, UK), čímž byly dané vzorky zvodivěny. Takto připravený materiál byl následně použit pro vlastní analýzu.



Obrázek 13: Skenovací elektronový mikroskop Tescan Vega 3

6.2.4 Imobilizace kyseliny hyaluronové

Hlavními parametry studovanými při imobilizační reakci kyseliny hyaluronové byla doba a pH pufru, ve kterém byla daná kyselina hyaluronová rozpuštěna. Na základě dostupných publikací, které se zabývaly imobilizací HA, byla zvolena časová škála v rozmezí 1 – 15 hodin. Konkrétně byly vzorky odebírány po 1, 3, 5, 10 a 15 hodinách. Zvolený rozsah hodnot pH byl od 3 – 6 a to konkrétně 3, 4, 5, 6. Popis celého procesu je uveden níže.

Nejprve byl připraven modifikovaný McIlvainův pufr na bázi hydrogenfosforečnanu didraselného a kyseliny citronové s hodnotou $\text{pH} = 6$. Následně byl pufr rovnoměrně rozdělen do 4 kádinek o objemech 250 ml. Takto rozdělené roztoky byly pomocí pH metru podrobeny úpravě pH na požadované hodnoty 3, 4, 5, 6. V připravených pufrech byla následně sodná sůl kyseliny hyaluronové. Rozpouštění probíhalo po dobu 24 hodin na magnetické míchače s nastavenou rychlostí na 350 ot/min.

K tomu, aby nastala imobilizační reakce, je potřeba dvou důležitých komponentů, EDC a NHS, tudíž bylo potřeba připravit zásobní roztoky těchto látek.

Princip jejich reakce je popsán v kapitole 2.1.1. Zásobní roztoky připravené v imobilizačním pufru měly koncentraci 0,75% EDC a 0,125% NHS. Po úplném rozpuštění všech látek byla provedena příprava kompletních imobilizačních roztoků, kdy byly v plastových zkumavkách smíseny všechny připravené komponenty ve vhodném pořadí. Připravené roztoky byly homogenizovány na rotační třepačce po dobu 15 minut při rychlosti 15 ot/min.

V připravených roztocích byla provedena imobilizace HA na předem silylované vzorky nanovlákných vrstev o rozměru 4 x 3 cm. Proces imobilizace probíhal ve vzduchově utěsněné Petriho misce a při agitaci na třepačce po určitou dobu při 150 ot/min. Po uplynutí stanovených časových úseků - 1, 3, 5, 10, 15 hodin, byla imobilizace ukončena odtažením imobilizačního roztoku a každá nanovlákná vrstva byla promyta 3 x 15 ml demineralizované vody, přičemž při každém promývání byly vzorky umístěny na třepačku po dobu 15 minut a při 150 ot/min. Následně byly vzorky pomocí jemné manipulace a pinzety přeneseny na podklad, kde se při laboratorní teplotě nechaly vysoušet.

6.2.5 Kvantitativní stanovení HA na povrchu SiO₂ nanovláken

Princip stanovení koncentrace kyseliny hyaluronové na povrchu křemičitých nanovláken je podobný principu používanému ke kvantitativnímu stanovení aminoskupin s tím rozdílem, že při této metodě není využíváno FITC jakožto značícího činidla aminoskupin, nýbrž je zde využíváno zakalení, které vzniká při reakci cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) s roztokem obsahujícím HA. Podrobný popis celého postupu je uveden níže.

Z důkladně vysušených nanovlákných vrstev (o rozměrech 4 x 3 cm) byly pomocí čtvercové raznice vyraženy vzorky o rozměrech 1 x 1 cm. Všechny vzorky byly zváženy na analytických vahách. Takto vyražené vzorky byly, stejně jako v případě kvantifikace rozpuštěny v 0,2 M roztoku hydroxidu sodného. Nanovlákná byla v uzavřených zkumavkách rozpuštěna při současné agitaci po dobu 24 hodin.

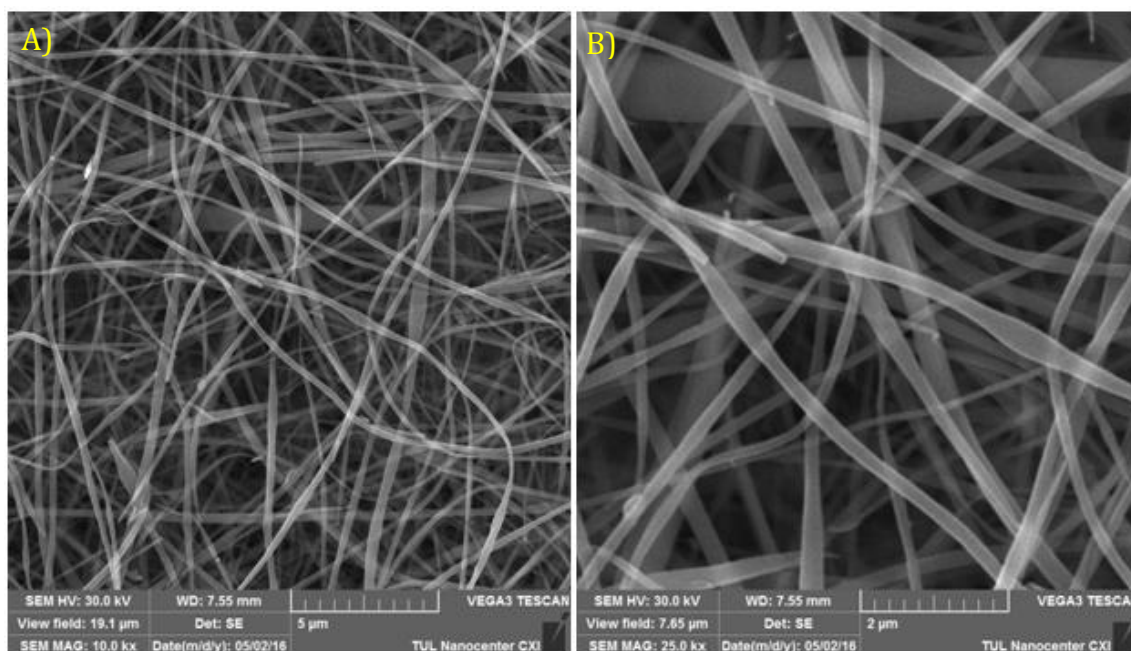
Takto získané roztoky byly použity ke kvantifikaci imobilizované kyseliny hyaluronové. Ta byla provedena smísením 100 µl testovaného roztoku se 100 µl roztoku CTAB. Před vyhodnocením byla mikrotitrační destička umístěna na třepačku při 100 ot/min po dobu 10 minut a inkubována při teplotě 37 °C. Kvantifikace přítomné kyseliny hyaluronové byla provedena na základě hodnot

absorbance (400 nm) naměřených přístrojem Microplate Reader Synergy HTX na 400 nm vlnové délky. U každého vzorku byla kvantifikace HA provedena ve třech opakováních. U každého opakování potom bylo hodnocení na Microplate Readeru provedeno v triplicátu tak, aby bylo možný výpočet základních statistických charakteristik. Kvantifikace HA byla provedena srovnáním s kalibrační křivkou. Ta byla připravena stejnou metodou s použitím roztoků kyseliny hyaluronové o známé koncentraci (viz Graf 6).

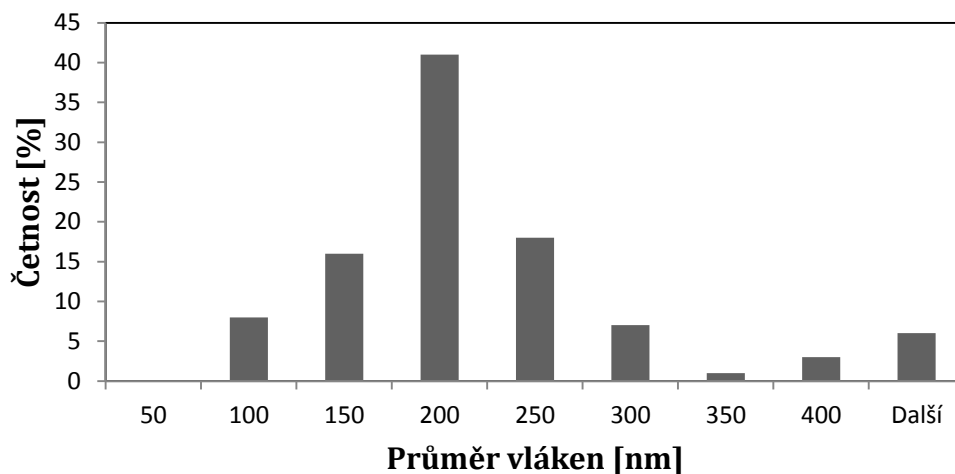
7 Výsledky měření a diskuze

7.1 Morfologie čistých křemičitých nanovláken

Morfologická analýza neupravených křemičitých nanovláken provedená elektronovou mikroskopií ukázala, že se jedná o vlákna poměrně uniformní a s hladkým povrchem, což také dokazují snímky pořízené ze skenovacího elektronového mikroskopu Tescan Vega 3 (Obrázek 14). Průměr těchto vláken před modifikací APTES byl stanoven na (210 ± 130) nm; $(\bar{x} \pm \sigma_{n-1}, n = 120)$. Histogram četností naměřených průměrů je uveden níže (Graf 1). V analyzované nanovlákně vrstvě byl pozorován malý počet silných vláken a vad. Ty mohou při elektrostatickém zvlákňování křemičitého solu vznikat vlivem odpařování rozpouštědla a tím způsobeným nárůstem koncentrace a tím i viskozity. Vady mohou v případě křemičitých nanovláken vznikat také vlivem klimatických podmínek (vzdušná vlhkost, teplota). Vznik nehomogenit vlivem klimatických podmínek může být vyřešen použitím klimatizační jednotky, která zajistí konstantní podmínky po celou dobu výrobního procesu.



Obrázek 14: Nanovláknina SiO_2 před modifikací APTES, snímky ze SEM zvětšení 10kx (A) a 25kx (B)



Graf 1: Histogram četností průměrů neupravených křemičitých nanovláken

7.2 Fluorescenční stanovení koncentrace aminoskupin

Spektrofotometrické metody, mezi které patří i metoda využívající reakce s FITC, jsou často užívány ke stanovení koncentrace funkčních skupin. Výhodou této metody je právě možnost kvantitativního stanovení koncentrace aminoskupin i v jejich nízkých koncentracích, na rozdíl od většiny analytických metod, které hodnotí přítomnost aminoskupin pouze kvalitativně nebo jsou tyto hodnoty pod jejich detekčním limitem. Použití spektrofotometrických metod může být naopak nevýhodné v případě vysokých koncentrací funkčních skupin na povrchu, kdy je horní limit citlivosti metody závislý na rozestupech mezi kvantifikovanými skupinami a dále na velikosti molekuly barviva (FITC). Jak je patrné z porovnání spekter označených jako SiO_2 a $\text{SiO}_2\text{-APTES}$ získaných metodou infračervené spektroskopie (FTIR) a zobrazených v Příloha A, není efekt silylace vzhledem k detekčním limitům této metody vůbec prokazatelný. Počet funkčních skupin vázaných na povrch nanovláken je tedy relativně malý. Z těchto důvodů byla pro ověření vlivu jednotlivých parametrů na účinnost silylace zvolena kvantifikace specifickou vazbou FITC na volné aminoskupiny. Výsledky analýzy provedené dle postupu uvedeného v kapitole 6.2.2 jsou uvedeny v tabulkách 2 až 4.

Tabulka 2: Výsledky fluorescence a koncentrace aminoskupin (1. měření)

Koncentrace APTES [% obj.]	Doba silylace [hod]	Fluorescence	Koncentrace NH ₂ [μM/L]	Váha NH ₂ [ng/cm ²]
2	1	818	2,66	128
	2	1381	5,10	245
	3	759	2,41	115
	4	1061	3,72	178
	5	942	3,20	154
3	1	702	2,16	104
	2	723	2,25	108
	3	1119	3,97	190
	4	907	3,05	146
	5	859	2,84	136
4	1	532	1,42	68
	2	765	2,43	117
	3	633	1,86	89
	4	776	2,48	119
	5	758	2,40	115

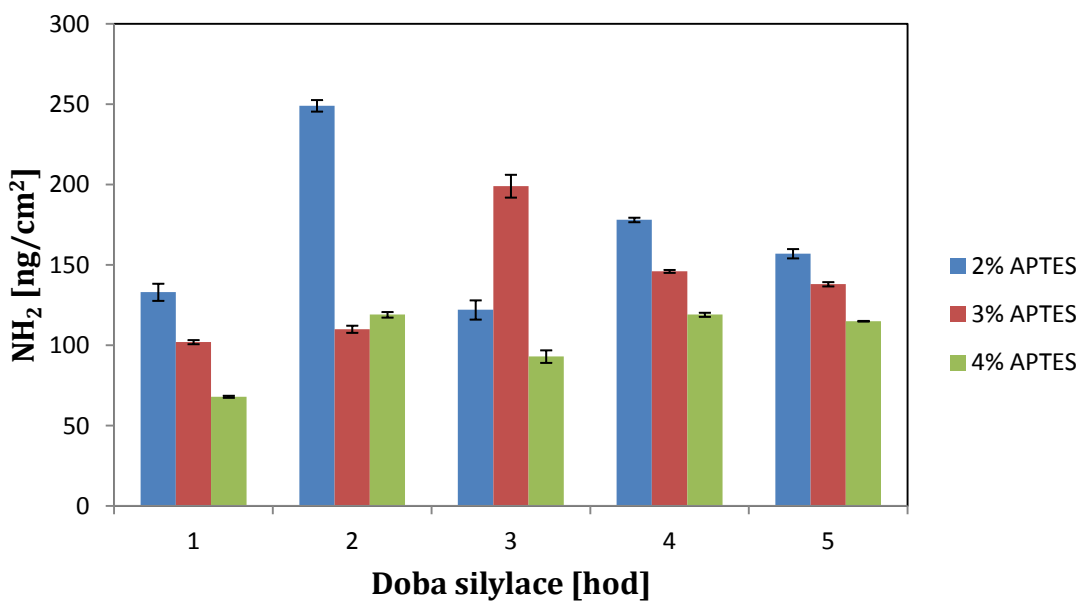
Tabulka 3: Výsledky fluorescence a koncentrace aminoskupin (2. měření)

Koncentrace APTES [% obj.]	Doba silylace [hod]	Fluorescence	Koncentrace NH ₂ [μM/L]	Váha NH ₂ [ng/cm ²]
2	1	847	2,79	134
	2	1413	5,24	252
	3	813	2,64	127
	4	1065	3,73	179
	5	967	3,31	159
3	1	694	2,12	102
	2	744	2,34	112
	3	1178	4,22	203
	4	899	3,01	145
	5	869	2,88	138
4	1	530	1,41	68
	2	781	2,50	120
	3	670	2,02	97
	4	784	2,51	121
	5	756	2,39	115

Tabulka 4: Výsledky fluorescence a koncentrace aminoskupin (3. měření)

Koncentrace APTES [% obj.]	Doba silylace [hod]	Fluorescence	Koncentrace NH ₂ [μM/L]	Váha NH ₂ [ng/cm ²]
2	1	869	2,88	138
	2	1408	5,22	251
	3	813	2,60	127
	4	1052	3,68	176
	5	967	3,30	159
3	1	690	2,11	101
	2	737	2,31	111
	3	1178	4,22	203
	4	906	3,04	146
	5	871	2,89	139
4	1	526	1,39	67
	2	777	2,48	119
	3	646	1,91	92
	4	772	2,46	118
	5	757	2,40	115

Kvantifikace byla vzhledem k nehomogenitě vzorků provedena v triplicátu pro každý typ vzorku. Zmíněná nehomogenita mohla být mírně ovlivněna i nespecifickou adsorpcí malého množství FITC na nanovlákná. Tento efekt by však měl být minimalizovaný důkladným promytím vzorků.



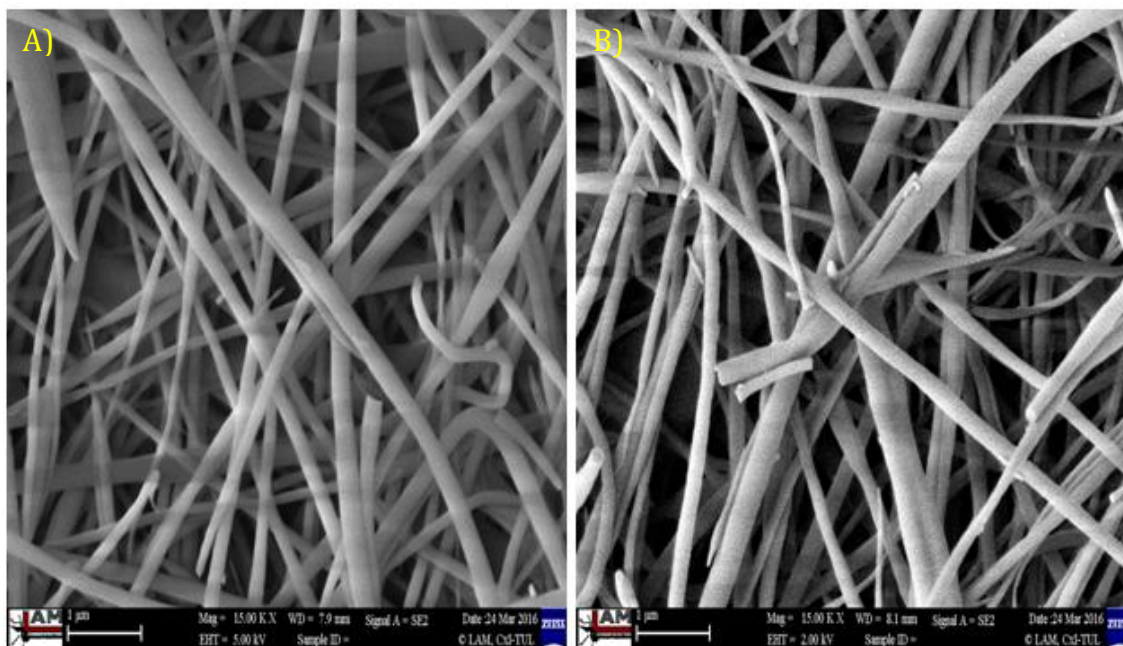
Graf 2: Závislost množství aminoskupin na době silylace při použití různých koncentrací modifikačního činidla APTES

Výsledné hodnoty uvedené v tabulkách výše (Tabulka 2, Tabulka 3, Tabulka 4) byly zprůměrovány a zaneseny do Graf 2. Z grafu je patrné, že nejvyšší výtěžnost aminoskupin byla u většiny časových bodů získána při použití silylačního roztoku s obsahem 2% APTES, což tedy znamená, že existuje určitá mezní koncentrace silylačního činidla, nad kterou již nedochází ke zvýšení počtu detekovatelných skupin. Příčiny toho limitu mohou být dvě. Za prvé může dojít k vyčerpání veškerých hydroxylových skupin dostupných se na povrchu křemičitých nanovláken použitím 2% roztoku APTES a tedy další nárůst koncentrace silylačního činidla se neprojeví. Druhou možností je, že se zvyšující se koncentrací APTES dojde k navázání takového množství aminoskupin na povrch křemičitých nanovláknenných substrátů, že metoda založená na reakci s FITC již není schopná aminoskupiny detekovat v důsledku omezení počtu navázaných molekul FITC, což je dáno sterickými nároky molekul barviva. Tato domněnka by však musela být ověřena s použitím minimálně jedné další kvantifikační metody. Nejvyšší průměrná hodnota navázaných aminoskupin, tedy 249 ng NH₂ na cm² nanovláknenného substrátu byla získána při modifikaci 2% roztokem APTES po dobu 2 hodin. Na základě tohoto výsledku byly tyto podmínky silylace zvoleny pro další experimenty.

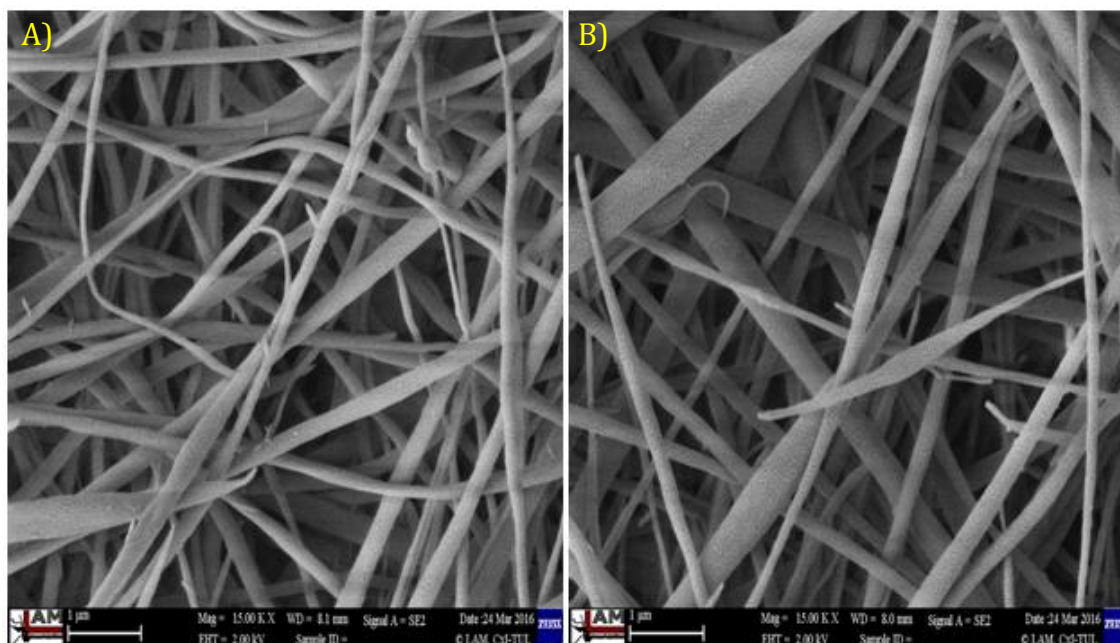
7.2.1 Morfologie křemičitých nanovláken po silylaci

Jak je patrné z výsledků silylace diskutovaných v předchozí kapitole, kvalita vzorku taktéž ovlivňuje výtěžnost silylační reakce. To se prokázalo při provádění silylačních reakcí díky použití vzorků odebraných z různých míst nanovláknenné vrstvy a tedy s odlišnou morfologií (průměrem nanovláken), která významně ovlivňuje měrný povrch nanovláknenné vrstvy. Tento efekt je patrný při porovnání výsledků silylace uvedených v tabulkách výše, kde pro každou skupinu vzorků (tabulku) byly vzorky odebrány v jiném místě vrstvy, což v důsledku vedlo k rozdílům v počtu navázaných aminoskupin při použití materiálu z okrajů a ze středu nanovláknenné vrstvy. Při kvantifikaci účinnosti silylace touto metodou a porovnatelnost výsledků je tedy důležité užití stejné šarže materiálu (tzn. vybírat stejné místo pro odběr vzorku pro všechny testy). Velice důležité je také ověřit morfologii použité nanovláknenné vrstvy před úpravou i po ní.

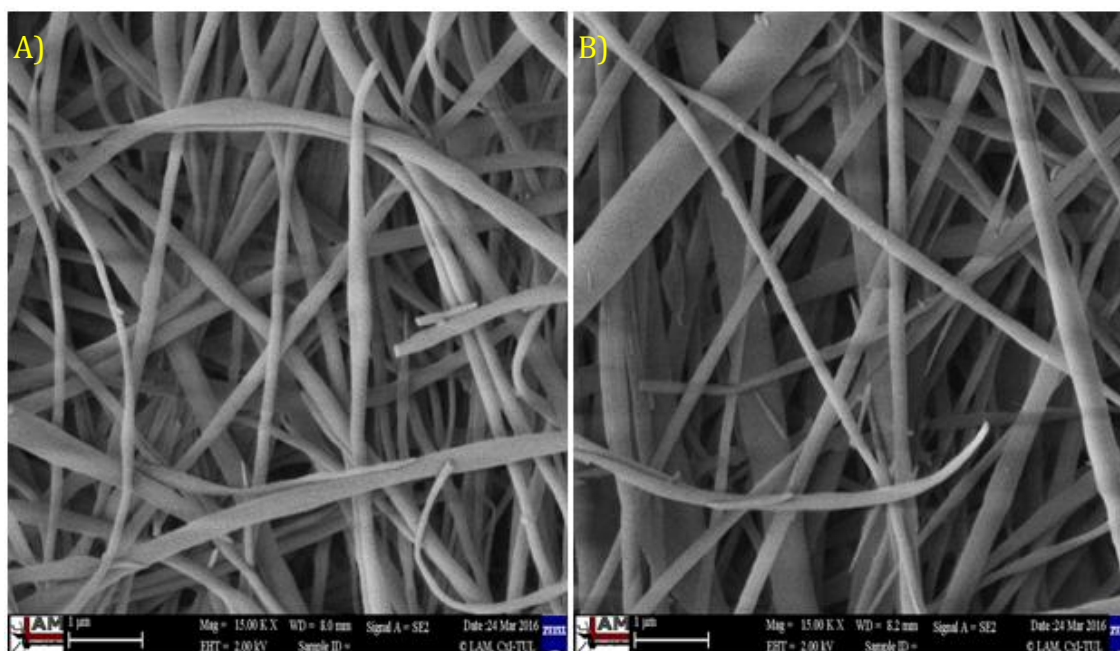
Snímky pořízené na skenovacím elektronovém mikroskopu Zeiss Ultra Plus, uvedené níže, ukazují kvalitu křemičité nanovlákněné vrstvy po silylační reakci při různých koncentracích modifikačního činidla APTES. Na snímcích po silylaci 2% roztokem APTES (Obrázek 15), 3% roztokem APTES (Obrázek 16) ani 4% roztokem APTES (Obrázek 17) nejsou patrné žádné výraznější změny v morfologii. Provedením silylace těmito roztoky tedy nedošlo k poškození nanovlákněné vrstvy, výrazné korozi povrchu nanovláken nebo jejich praskání. U těchto nanovlákněných vrstev byly naměřeny průměry vláken pro 2% roztok APTES (180 ± 90) nm, pro 3% roztok APTES (190 ± 110) nm a pro 4% roztok APTES (190 ± 160) nm. Při porovnání s průměry neupravených nanovláken (210 ± 130) nm je vidět, že silylace měla vliv na morfologii nanovláken a u ve všech případech silylace došlo k mírnému snížení průměrné hodnoty jejich průměru.



Obrázek 15: Nanovláknena SiO_2 po modifikaci 2% roztokem APTES, snímky ze SEM zvětšení 15kx, odběr po 1h (A) a po 5h (B)



Obrázek 16: Nanovlákná SiO_2 po modifikaci 3% roztokem APTES, snímky ze SEM zvětšení 15kx, odběr po 1h (A) a po 5h (B)

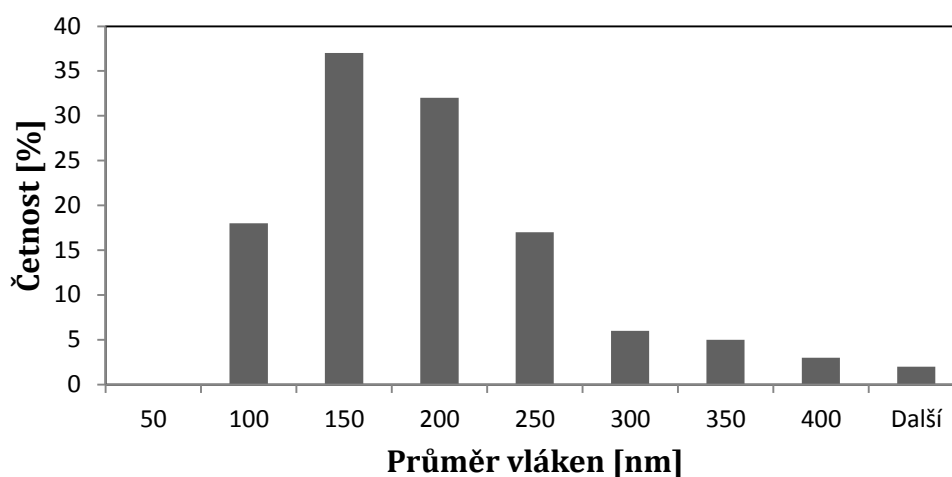


Obrázek 17: Nanovlákná SiO_2 po modifikaci 4% roztokem APTES, snímky ze SEM zvětšení 15kx, odběr po 1h (A) a po 5h (B)

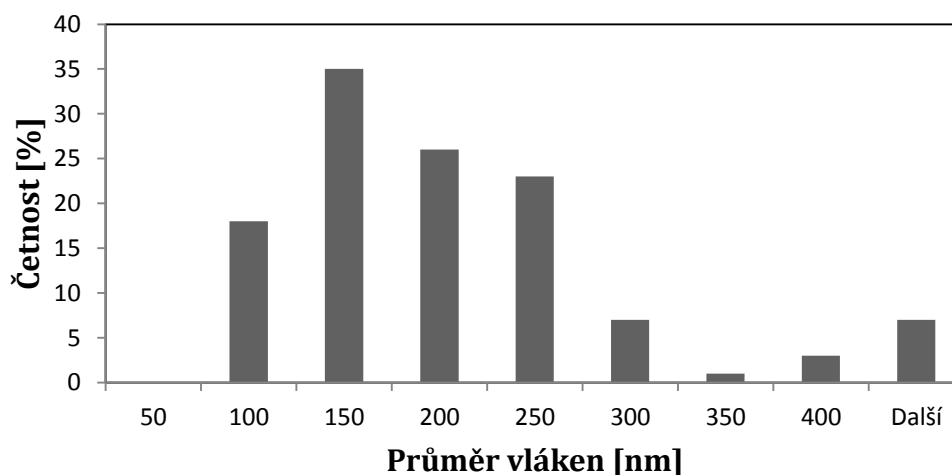
V níže uvedených histogramech je zaznamenáno zastoupení jednotlivých průměrů nanovláken ve vzorcích po silylaci 2% roztokem APTES (Graf 3), 3% roztokem APTES (Graf 4) a 4% roztokem APTES (Graf 5). Jak je patrné, tak jednotlivá zastoupení průměrů ve vzorcích se mírně odlišují četností jednotlivých

průměrů ve vzorku. Tato odlišnost je způsobena ne zcela homogenní vrstvou nanovláknenného substrátu. Ovšem změny ve všech případech jsou minimální a tedy nejvyšší zastoupení v křemičité vrstvě mají vlákna s průměrem 150 – 200 nm.

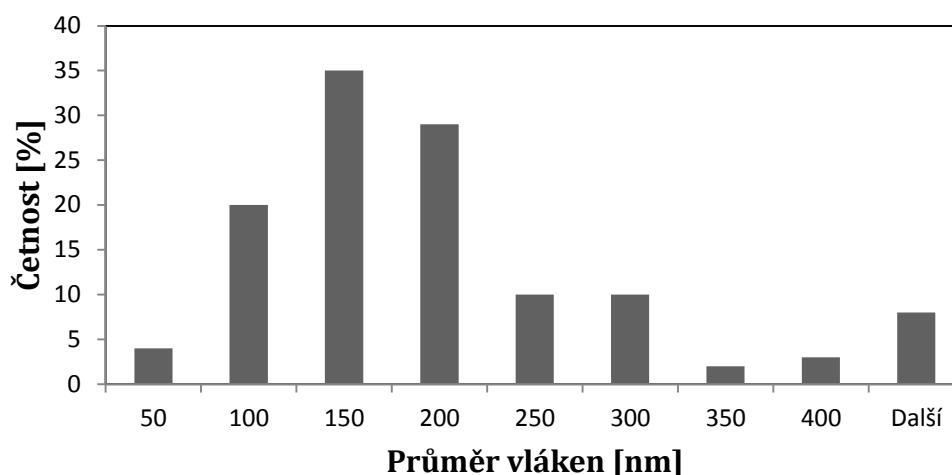
Na základě SEM analýzy je tedy možné říci, že proces silylace nevede k poškození nanovláken, ale způsobuje mírné změny v jejich průměrech. Toto, že silylace povrchu nevede k poškozování povrchu vláken, je důležité hlavně pro další modifikace povrchu – např. imobilizaci kyseliny hyaluronové.



Graf 3: Histogram četnosti průměrů křemičitých nanovláken po modifikaci 2% roztokem APTES



Graf 4: Histogram četnosti průměrů křemičitých nanovláken po modifikaci 3% roztokem APTES

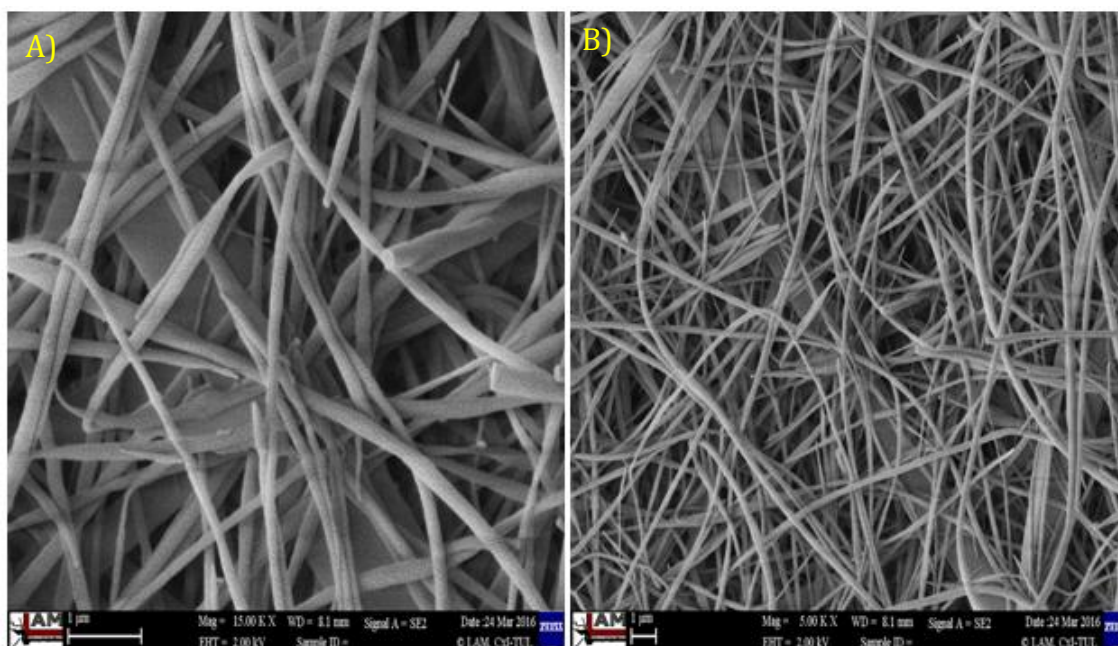


Graf 5: Histogram četnosti průměrů křemičitých nanovláken po modifikaci 4% roztokem APTES

7.2.2 Optimální podmínky silylační reakce

V souladu s daty získanými za různých reakčních podmínek (viz kapitola 7.2), které jak se ukázalo, výrazně ovlivňují průběh silylační reakce křemičitých nanovláken, byly stanoveny optimální podmínky reakce s cílem maximalizovat výtěžnost aminoskupin po silylaci.

Jako optimum bylo vybráno použití silylačního činidla o koncentraci 2% obj. APTES v ethanolu, kdy byl zjištěn nejvyšší nárůst koncentrace aminoskupin po reakci. Optimální délka reakce byla stanovena na dvě hodiny a to z toho důvodu, že po dvou hodinách již nedocházelo k výraznému nárůstu koncentrace aminoskupin.

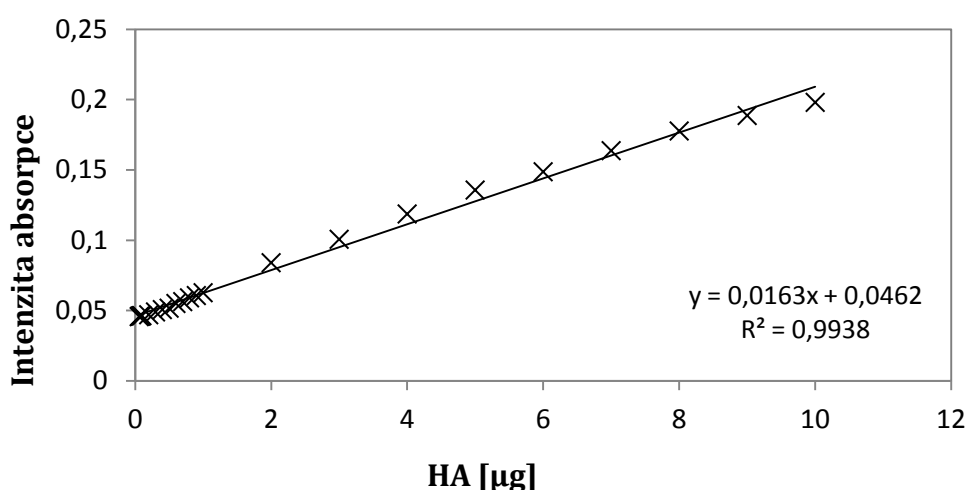


Obrázek 18: Struktura nanovláknenného substrátu po silylaci při optimálních podmínkách, zvětšení 15kx (A) a 5kx (B)

7.3 Kvantitativní stanovení imobilizované HA

Po silylaci vzorků při zvolených optimálních podmínkách a následné imobilizaci HA, kde byl zkoumán vliv pH pufru a doby na výtěžnost kyseliny hyaluronové navázané na povrchu křemičitých nanovláknenných substrátů (SiO₂-APTES-HA), byla provedena kvantifikace prostřednictvím specifické reakce kyseliny hyaluronové s roztokem CTAB, která vede ke vzniku detekovatelného zákalu. Postup kvantifikace je uveden v kapitole 6.2.5.

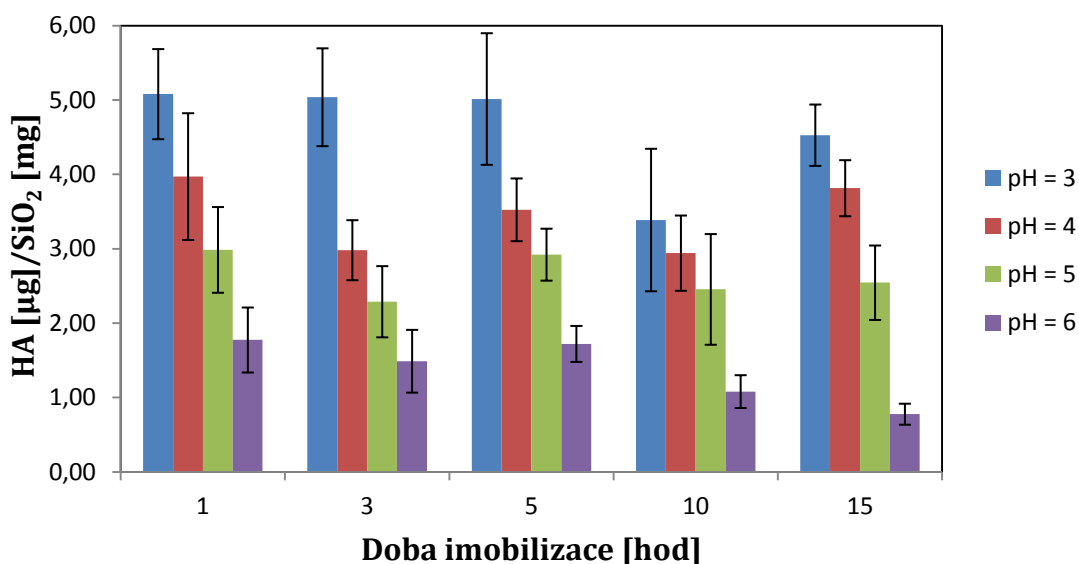
Vzhledem k možným nehomogenitám v nanovláknenném substrátu byla provedena silylace a následná imobilizace křemičitých nanovláken v duplikátu. Měření absorbance jednotlivých roztoků obsahujících HA bylo provedeno v triplicátu. Vyhodnocení množství navázané kyseliny hyaluronové bylo provedeno na základě kalibrační křivky (Graf 6) a naměřených hodnot absorbance.



Graf 6: Kalibrační křivka závislosti intenzity absorpce při čtení na 400 nm

Tabulka 5: Přehled hodnot udávajících množství HA vztažené na 1 mg SiO₂

Doba imobilizace	pH = 3		pH = 4		pH = 5		pH = 6	
	Absorbance	HA [μg]/SiO ₂ [mg]	Absorbance	HA [μg]/SiO ₂ [mg]	Absorbance	HA [μg]/SiO ₂ [mg]	Absorbance	HA [μg]/SiO ₂ [mg]
1 hod	0,063	5,08	0,061	3,97	0,057	2,99	0,053	1,77
3 hod	0,068	5,04	0,060	2,98	0,056	2,29	0,053	1,49
5 hod	0,068	5,01	0,063	3,52	0,058	2,92	0,054	1,72
10 hod	0,064	3,39	0,059	2,94	0,058	2,45	0,052	1,08
15 hod	0,067	4,53	0,063	3,81	0,057	2,54	0,050	0,78



Graf 7: Kvantitativní závislosti HA na době imobilizace při různých hodnotách pH

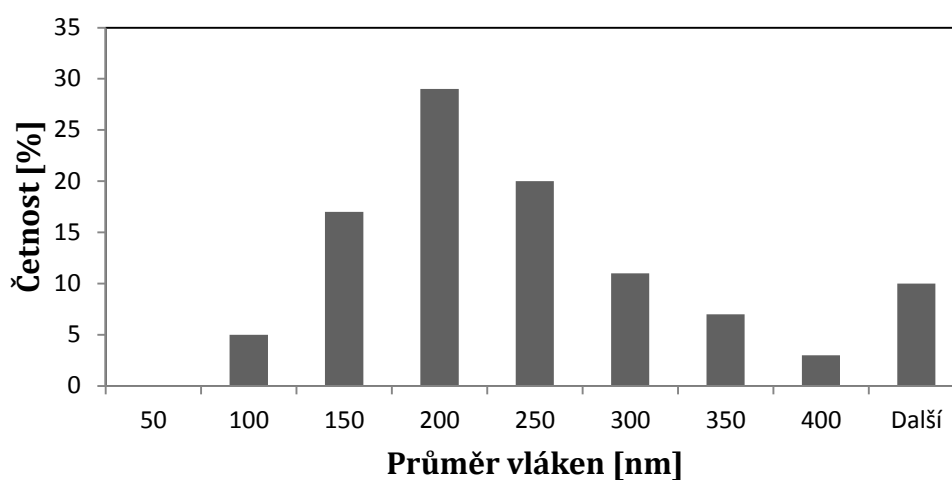
Z výše uvedené tabulky (Tabulka 5) a grafu (Graf 7) shrnujících výsledky analýzy je patrné, že nejvyšší nárůst hmotnosti kyseliny hyaluronové navázané na křemičitá nanovlákná byl zaznamenán při pH = 3 a to ihned po první hodině imobilizace. Ukázalo se tedy, že pH pufru, ve kterém byla kyselina hyaluronová rozpuštěna, mělo zásadní vliv na výslednou výtěžnost kyseliny hyaluronové. Tento nárůst může být způsoben tím, že při kyselých podmínkách dochází převážně k reakci na COOH skupinách, což vede k usnadnění reakce s EDC, která je podstatou této imobilizační reakce.

7.3.1 Morfologie křemičitých nanovláken po imobilizaci

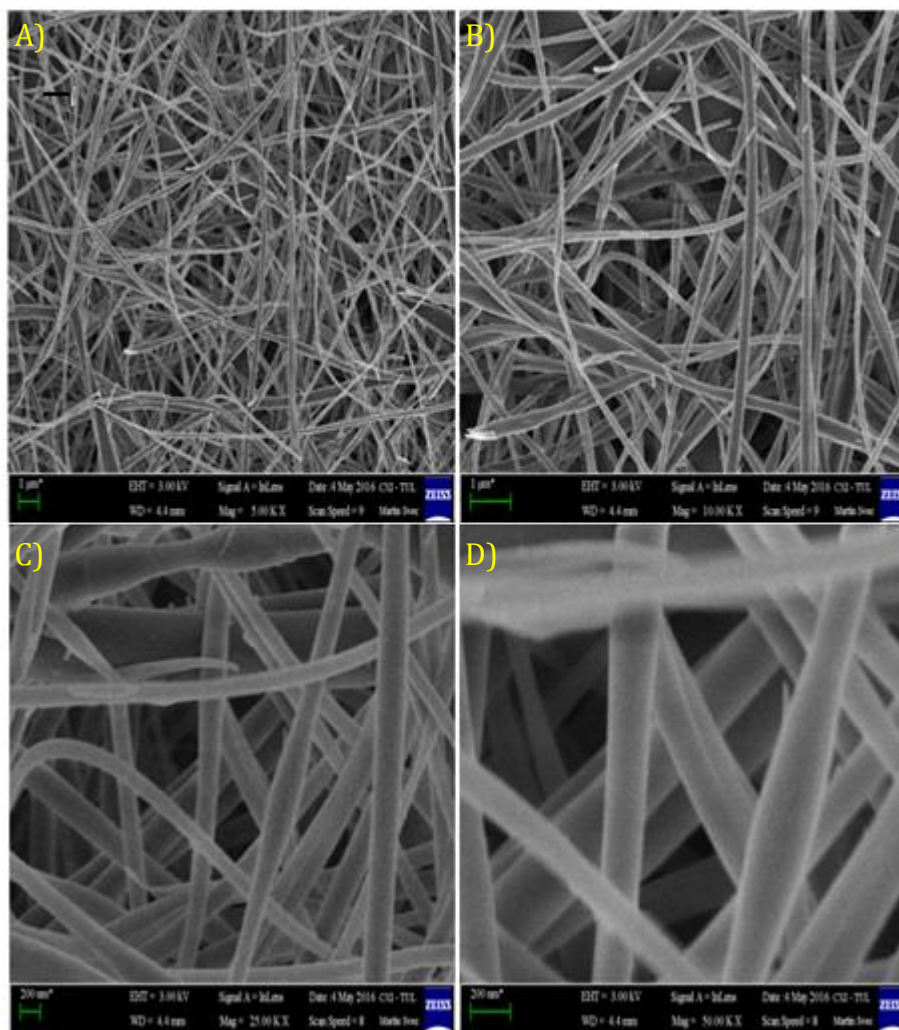
Výsledky po provedené imobilizaci kyseliny hyaluronové rovněž ukázaly, že téměř nedošlo k významným změnám v morfologii nanovláknenného substrátu, přičemž průměr vláken odpovídá hodnotě (230 ± 130) nm (Graf 8) v případě pH = 3 a 1 hodiny imobilizace. Bylo tak prokázáno, že ani jeden z modifikačních procesů (silylace či imobilizace) zásadně negativně neovlivňuje morfologii křemičitých nanovláknenných substrátů.

Níže uvedený snímek (Obrázek 19) pořízený elektronovým mikroskopem Zeiss Ultra plus dokumentuje strukturu nanovláknenného substrátu po imobilizaci kyseliny hyaluronové. Při menším zvětšení je patrné, že nedochází k žádným defektům, ať už k ucpaní pórů nanovláknenného materiálu, či k poškození

jednotlivých vláken. To bylo potvrzeno i u nanovláken připravených při odlišných podmínkách imobilizace (viz Příloha B, Příloha C). Při větším zvětšení je ukázáno, že vlivem imobilizační reakce nedochází ke korozi povrchu jednotlivých nanovláken. Z analýzy průměrů upravených nanovláken vyplývá, že došlo k mírnému nárůstu průměru nanovláken. To může být způsobeno buď formováním vrstvy HA s tloušťkou v řádech nanometrů na povrchu nanovláken, nebo mírným bobtnáním nanovláken vlivem úpravy ve vodném roztoku nebo jejich kombinací.



Graf 8: Histogram četnosti průměrů křemičitých nanovláken po 1 hodině imobilizace kyseliny hyaluronové při $pH = 3$



Obrázek 19: Struktura SiO_2 nanovláken po 1 hodině imobilizace kyseliny hyaluronové při pH = 3 a při zvětšení 5kx (A), 10kx (B), 25kx (C) a 50kx (D)

Byla také ověřena možnost kvantifikace kyseliny hyaluronové na nanovlákních metodou FTIR prostřednictvím pro ni typických absorpčních maxim ve vlnočtech 3400 cm^{-1} a v oblasti $1550 - 1800 \text{ cm}^{-1}$. Vzhledem k velmi malému podílu kovalentně vázané kyseliny hyaluronové na povrchu nanovláken se však její přítomnost vůbec nepodařilo prokázat a její podíl se tedy pohybuje pod detekčním limitem této metody. V příloze A je uvedeno srovnání vybraných spekter zaznamenaných křemičitých nanovláken před úpravou, po silylaci a po imobilizaci HA při různých pH.

Závěr

V rámci experimentální části byla provedena optimalizace silylační reakce s využitím 3-aminopropyltriethoxysilanu jako modifikačního činidla. Optimalizace byla provedena s ohledem na maximální výtěžnost kovalentně navázaných aminoskupin na povrch křemičitých nanovláken. Sledovanými parametry byly – doba reakce a koncentrace silylačního činidla. Pro zhodnocení experimentů byla použita spektrofotometrická metoda založená na reakci fluorescein-isothiokyanátu s aminoskupinami nacházejícími se na povrchu křemičitých nanovláken. Z naměřených výsledků byly následně určeny optimální podmínky silylace – tedy 2% roztok APTES v ethanolu reaguje s křemičitými nanovláčennými substráty po dobu dvou hodin. Výsledky jsou podrobně diskutovány v kapitole 7.2.

Dále byl zkoumán vliv podmínek na imobilizaci kyseliny hyaluronové na povrch modifikovaných nanovláken. Bylo zjištěno, že při nejnižší hodnotě pH, tj. 3, dochází k maximálnímu nárůstu kvantity kyseliny hyaluronové navázané na povrch křemičitých nanovláken a to již po jedné hodině imobilizace. Takto rychlý nárůst může být způsoben tím, že v kyselém prostředí dochází k snazší reakci karboxylové funkční skupiny kyseliny hyaluronové s použitým imobilizačním činidlem EDC, a že pH reakce je tedy významnějším parametrem než doba jejího průběhu. Všechny výsledky jsou diskutovány v kapitole 7.3.

Předmětem dalšího studia by mohlo být prozkoumání vlivu dalších parametrů na účinnost imobilizační reakce kyseliny hyaluronové na povrch substrátu s cílem maximálního výtěžku kyseliny hyaluronové při použití minimálního imobilizovaného množství.

Seznam použité literatury

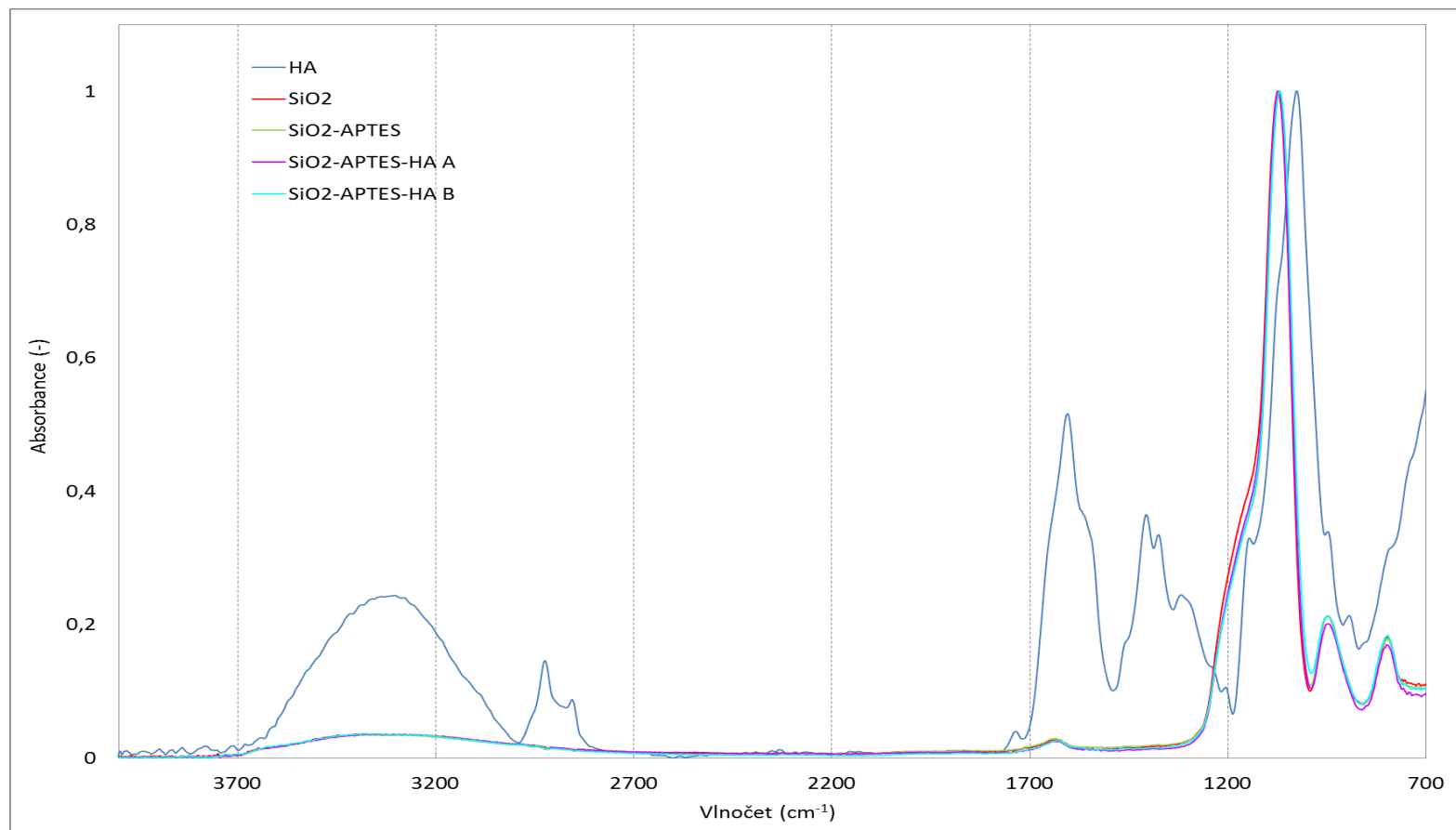
- [1] SLÍVA J., MINÁRIK J., *Hyaluronát – nejen pasivní pozorovatel, nýbrž aktivní modulátor imunních reakcí*, New EU Magazine of Medicine, 2009, Vol. 1, no. 2, pp. 75-79
- [2] COWMAN M. K. et. al., *The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues*, Frontiers in Immunology, 2015, Vol. 6, ISSN 1664-3224
- [3] NEČAS J. et. al., *Hyaluronic acid (hyaluronan): a review*, Veterinarni medicina, 2008, Vol. 53, no. 8, pp. 397-411
- [4] KRPALOVÁ Z., *Kyselina hyaluronová a její využití v medicíně a kosmetice*, Zlín, 2012, Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Vedoucí bakalářské práce Věra Kašpárková
- [5] YOUNG D. S., *Hyaluronic acid-based nanofibers via electrospinning*, 2006, URL: <http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.16/484>
- [6] VELEBNÝ V., *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*, Brno, 2012, Habilitační práce, Vysoké učení technické, Fakulta chemická
- [7] KOGAN G. et. al., *Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications*, Biotechnology Letters, 2006, Vol. 29, no. 1, pp. 17-25, ISSN 0141-5492, 1573-6776
- [8] Hyalogic, *Hyaluronic Acid: History, Chemical structure, and its benefits for the body*, [online], 22. 4. 2016 URL: <https://www.hyalogic.com/main/about-hyaluronic-acid>
- [9] BALLADA A. et. al., *Handbook of polymer research: monomers, oligomers, polymers and composites*. Nova Publishers, 2007, Chap. 31, ISBN-10: 1-60021-651-X, ISBN-13: 978-1-60021-651-0
- [10] LESLEY J. et. al., *CD44 in inflammation and metastasis*, Glycoconjugate Journal, 1997, Vol. 5, pp. 611-622
- [11] SCHANTÉ C. E. et. al., *Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications*, Carbohydrate Polymers, 2011, Vol. 85, no. 3, pp. 469-489, ISSN 0144-8617
- [12] PRESTWICH G. D. et. al., *Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives*, Journal of Controlled Release, 1998, Vol. 53, no. 1-3, pp. 93-103, ISSN 0168-3659
- [13] BULPITT P., AESCHLIMANN D., *New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels*, Journal of Biomedical Materials Research, 1999, Vol. 47, no. 2, pp. 152-169, ISSN 1097-4636,
- [14] MAGNANI A. et. al., *Novel polysaccharide hydrogels: characterization and properties*, Polymers for Advanced Technologies, 2000, Vol. 11, no. 8-12, pp. 488-495, ISSN 1099-1581

- [15] BERGMAN K. et. al., *Hyaluronic acid derivatives prepared in aqueous media by triazine-activated amidation*, *Biomacromolecules*, 2007, Vol. 8, no. 7, pp. 2190–2195, ISSN 1525-7797
- [16] DELLA VALLE F., ROMEO A., 1986, US4851521
- [17] HUIN-AMARGIER C. et. al., *New physically and chemically crosslinked hyaluronate (HA)-based hydrogels for cartilage repair*, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 2006, Vol. 76, no. 2, pp. 416–424, ISSN 1549-3296
- [18] HIRANO K. et. al., *Preparation of the methyl ester of hyaluronan and its enzymatic degradation*, *Carbohydrate Research*, 2005, Vol. 340, no. 14, pp. 2297–2304, ISSN 00086215
- [19] BENCHERIF S. A. et. al., *Influence of the degree of methacrylation on hyaluronic acid hydrogels properties*, *Biomaterials*, 2008, Vol. 29, no. 12, pp. 1739–1749, ISSN 01429612
- [20] BALAZS E., LESCHINER A., 1968, US4582865
- [21] NEVES-PETERSEN M. T. et. al., *Biophysical Properties of Phenyl Succinic Acid Derivatized Hyaluronic Acid*, *Journal of Fluorescence*, 2010, Vol. 20, no. 2, pp. 483–492, ISSN 1053-0509, 1573-4994
- [22] SMEDS A. K., GRINSTAFF M. W., *Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2001, Vol. 54, no. 1, pp. 115–121, ISSN 1097-4636
- [23] TOMIHATA K., IKADA Y., *Crosslinking of hyaluronic acid with glutaraldehyde*, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1997, Vol. 35, no. 16, pp. 3553–3559, ISSN 1099-0518
- [24] MLCOCHOVA P. et. al., *Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives*, *Biopolymers*, 2006, Vol. 82, pp. 74–79
- [25] COLLINS M. N., BIRKINSHAW C., *Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review*, *Carbohydrate Polymers*, 2013, Vol. 92, no. 2, pp. 1262–1279, ISSN 01448617
- [26] XU X. et. al., *Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex network*, *Soft Matter*, 2012, Vol. 8, no. 12, pp. 3280. ISSN 1744-683X, 1744-6848
- [27] YANG X., *Multi-functional Hyaluronan Based Biomaterials for Biomedical Applications*, 2014, ISSN 1651-6214, ISBN 978-91-554-8974-8
- [28] KIRKER K. R. et. al., *Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing*, *Biomaterials*, 2002, Vol. 23, no. 17, pp. 3661–3671, ISSN 0142-9612
- [29] JIA X. et. al., *Prolongation of sciatic nerve blockade by in situ cross-linked hyaluronic acid*, *Biomaterials*, 2004, Vol. 25, no. 19, pp. 4797–4804. ISSN 01429612
- [30] CHEN J. D. et. al., *In situ fabrication of nano hydroxyapatite in a macroporous chitosan scaffold for tissue engineering*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2009, Vol. 20, pp. 1555–1565

- [31] VENUGOPAL J. et. al., *Interaction of cells and nanofiber scaffolds in tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2008, Vol. 84B, no. 1, pp. 34–48. ISSN 1552-4981
- [32] PRESTWICH G. D., *Hyaluronic Acid-Based Clinical Biomaterials Derived for Cell and Molecule Delivery in Regenerative Medicine*, Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 2011, Vol. 155, no. 2, pp. 193–199, ISSN 0168-3659
- [33] BURDICK J. A., PRESTWICH G. D., *Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications*, Advanced Materials, 2011, Vol. 23, no. 12, pp. H41–H56, ISSN 09359648
- [34] SKARDAL A. et. al., *Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates*, Biomaterials, 2010, Vol. 31, pp. 6173–6181
- [35] LI J. et. al., *Electrospinning of Hyaluronic Acid (HA) and HA/Gelatin Blends*, Macromolecular Rapid Communications, 2006, Vol. 27, no. 2, pp. 114–120, ISSN 1521-3927
- [36] JI Y. et. al., *Electrospun three-dimensional hyaluronic acid nanofibrous scaffolds*, Biomaterials, 2006, Vol. 27, pp. 3782–3792
- [37] MIRONOV V. et. al., *Fabrication of tubular tissue constructs by centrifugal casting of cells suspended in an in situ crosslinkable hyaluronan-gelatin hydrogel*, Biomaterials, 2005, Vol. 26, no. 36, pp. 7628–7635, ISSN 0142-9612
- [38] MURPHY C. M., O'BRIEN F. J., *Understanding the effect of mean pore size on cell activity in collagen-glycosaminoglycan scaffolds*, Cell Adhesion & Migration, 2010, Vol. 4, no. 3, pp. 377–381, ISSN 1933-6918
- [39] BENT A. et. al., *Collagen implant for treating stress urinary incontinence in women with urethral hypermobility*, Journal of Urology, 2001, Vol. 166, pp. 1354–1357
- [40] FAGIEN S., CASSUTO D., *Reconstituted injectable hyaluronic acid: expanded applications in facial aesthetics and additional thoughts on the mechanism of action in cosmetic medicine*, Plastic and Reconstructive Surgery, 2012, Vol. 130, pp. 208–217
- [41] CHANG S. J. et. al., *In vitro properties of gellan gum sponge as the dental filling to maintain alveolar space*, Carbohydrate Polymers, 2012, Vol. 88, pp. 684–689
- [42] GALASSI G. et. al., *In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold*, Biomaterials, 2002, Vol. 21, pp. 2183–2191
- [43] TAN H. et. al., *Injectable in situ forming biodegradable chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for cartilage tissue engineering*, Biomaterials, 2009, Vol. 30, pp. 2499–2506
- [44] FREYMANN U. et. al., *Expanded human meniscus-derived cells in 3-D polymer hyaluronan scaffolds for meniscus repair*, Acta Biomaterialia, 2011, Vol. 8, pp. 677–685.

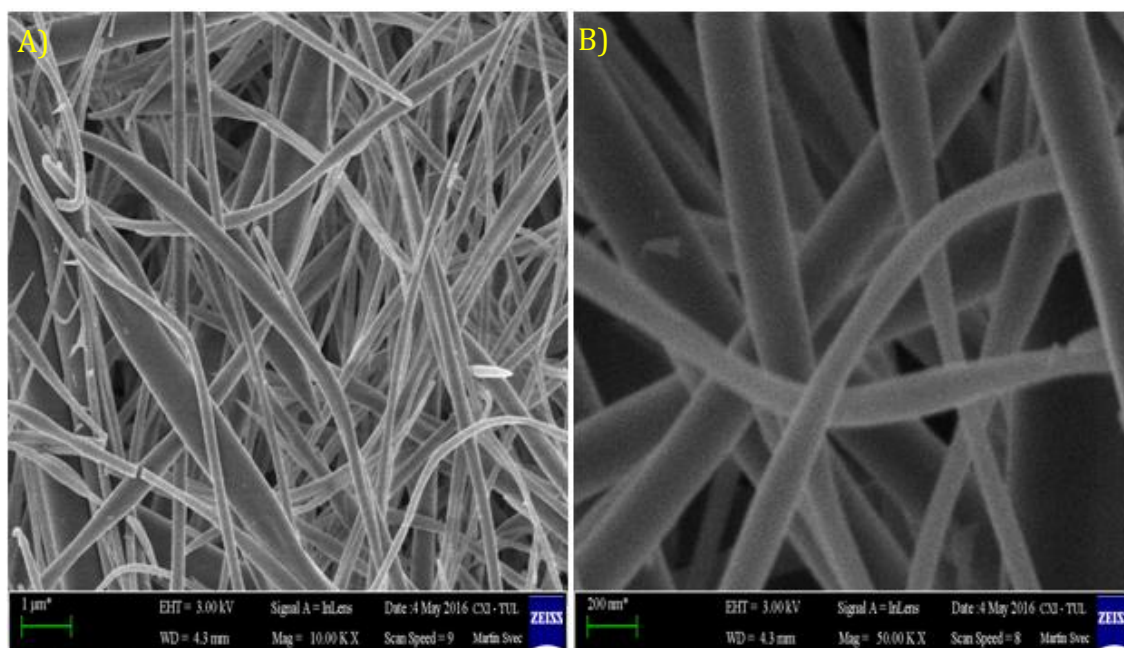
- [45] WANG X. et. al., *Hyaluronic acid-based scaffold for central neural tissue engineering*, Interface Focus, 2012, Vol. 2, pp. 278–291
- [46] NESTI L. J. et. al., *Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam*, Tissue Engineering, Part A, 2008, Vol. 14, pp. 1527–1537
- [47] PARK J. et. al., *Nerve regeneration following spinal cord injury using matrix metalloproteinase-sensitive, hyaluronic acid-based biomimetic hydrogel scaffold containing brain-derived neurotrophic factor*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010 Vol. 93A, pp. 1091–1099
- [48] BOSWORTH A. L., DOWNES S., *Electrospinning for tissue regeneration*, Woodhead Publishing, Philadelphia, 2011, pp. 317–339, ISBN: 978-1-114-569-741-9
- [49] LUŠTICKÁ I., *Funkcionalizace mezoporézních silikátových materiálů*, Chem. Listy, 2013, Vol. 107, pp. 114–120
- [50] LIBERMAN A. et. al., *Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine*, Surface Science Reports, Vol. 69, pp. 132 – 158
- [51] ŠLAMBOŘOVÁ I., EXNAR P., *Biomedicínské aplikace anorganických nanovláken na bázi oxidu křemičitého*, 2014, [online], 1. 5. 2014, URL: <http://www.kch.tul.cz/publications/sb35.pdf>
- [52] Technická univerzita v Liberci, Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace, IA3: Nové typy nanovláknenných biodegradabilních krytí těžce se hojících ran, [online], 5. 5. 2016, URL: https://cxi.tul.cz/projekty-vav/Preseed_Maryska/IA3_Obvazy.html
- [53] ŠEPS M., *Funkcionalizace křemičitých nanovláken přírodními látkami s biologickou aktivitou*, Liberec, 2015, Diplomová práce, Technická univerzita v Liberci, Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, Vedoucí bakalářské práce Lenka Martinová

Příloha A

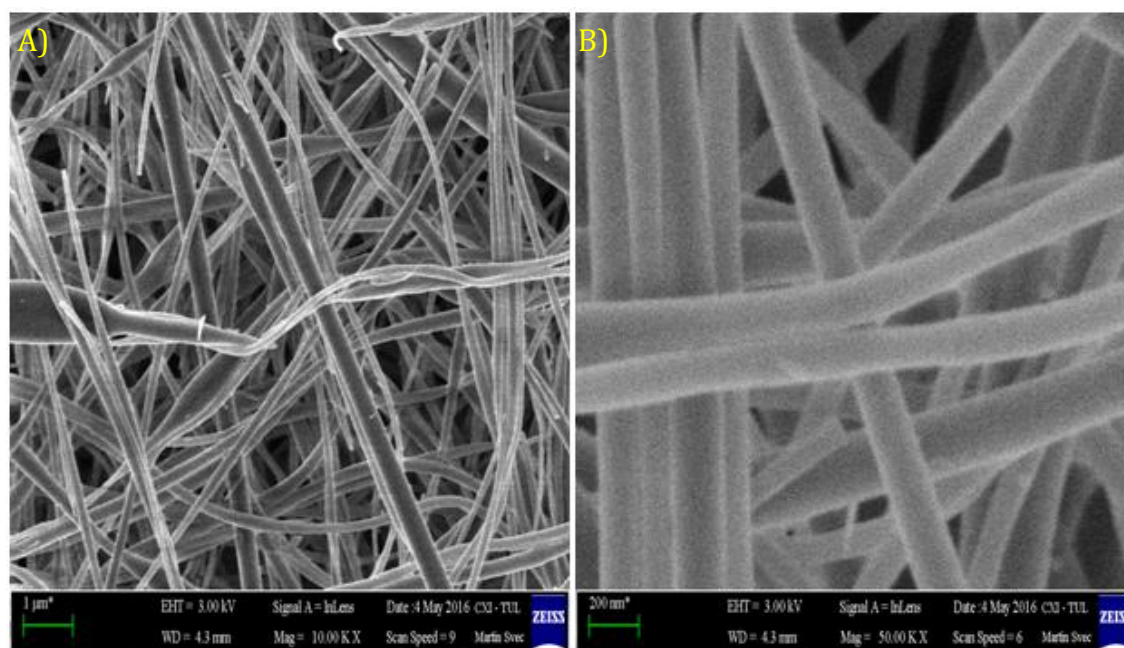


Graf 9: FTIR spektra vybraných vzorků křemičitých nanovláken (SiO₂) bez úpravy, (SiO₂-APTES) po silylaci 2% APTES po dobu 2 hodin, (SiO₂-APTES-HA A) po imobilizaci HA při pH = 3 a (SiO₂-APTES-HA B) po imobilizaci HA při pH = 6. Spektra jsou srovnána se spektrem neupravené kyseliny hyaluronové (HA). Měření provedeno na zařízení Nicolet iZ10 s použitím ATR nástavce.

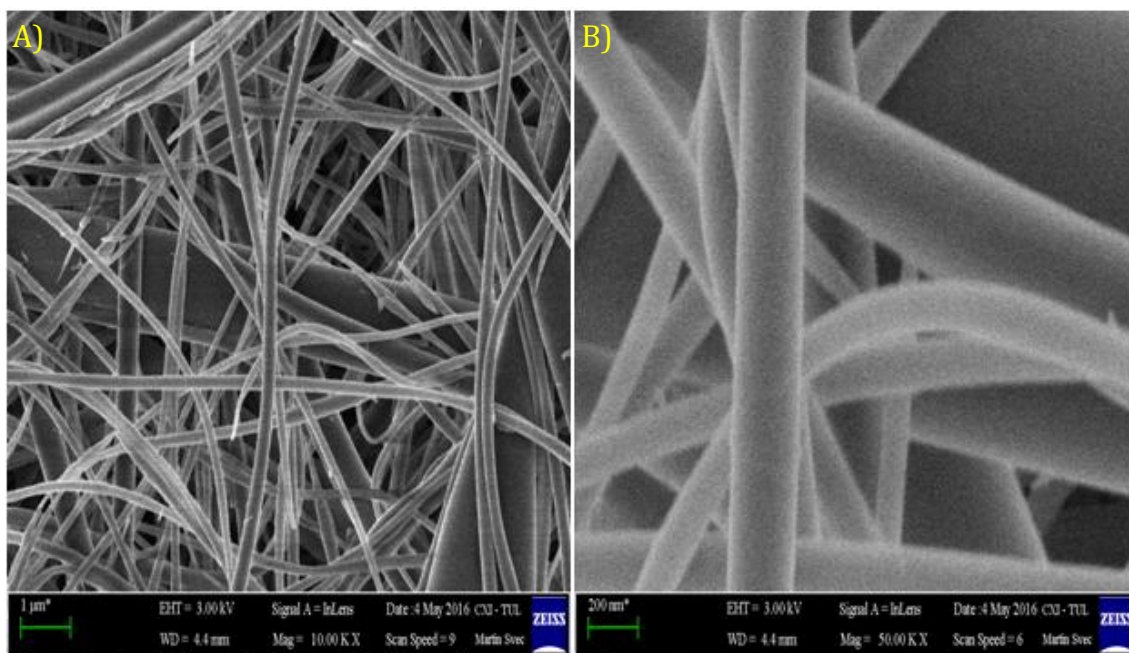
Příloha B



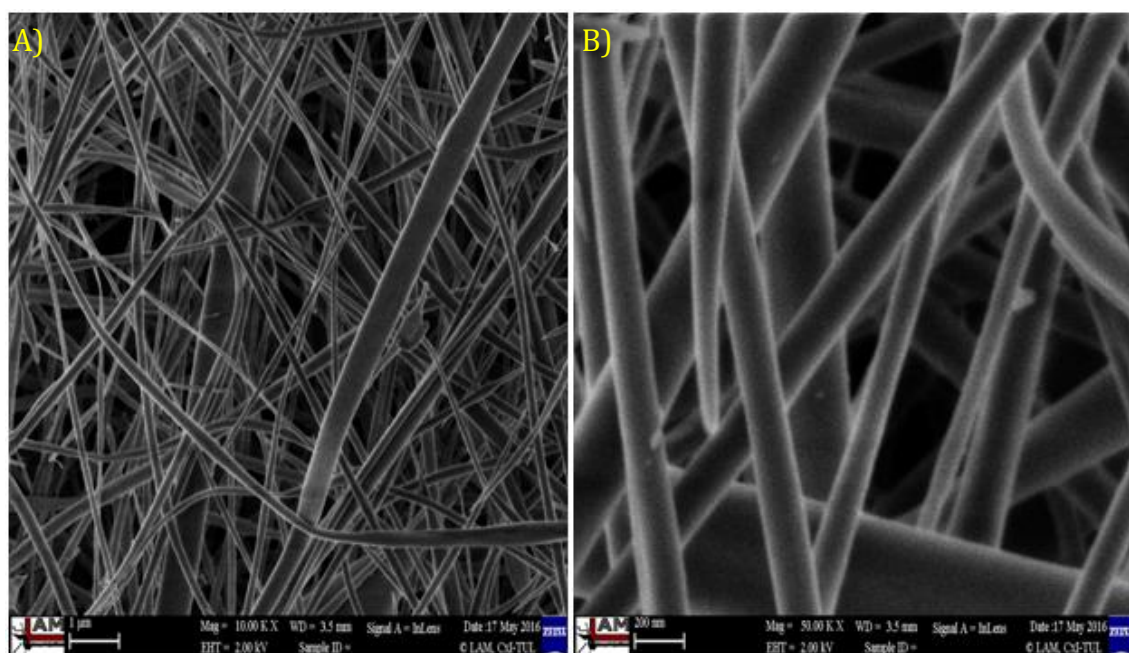
Obrázek 20: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 3 po dobu 3 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)



Obrázek 21: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 3 po dobu 5 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)

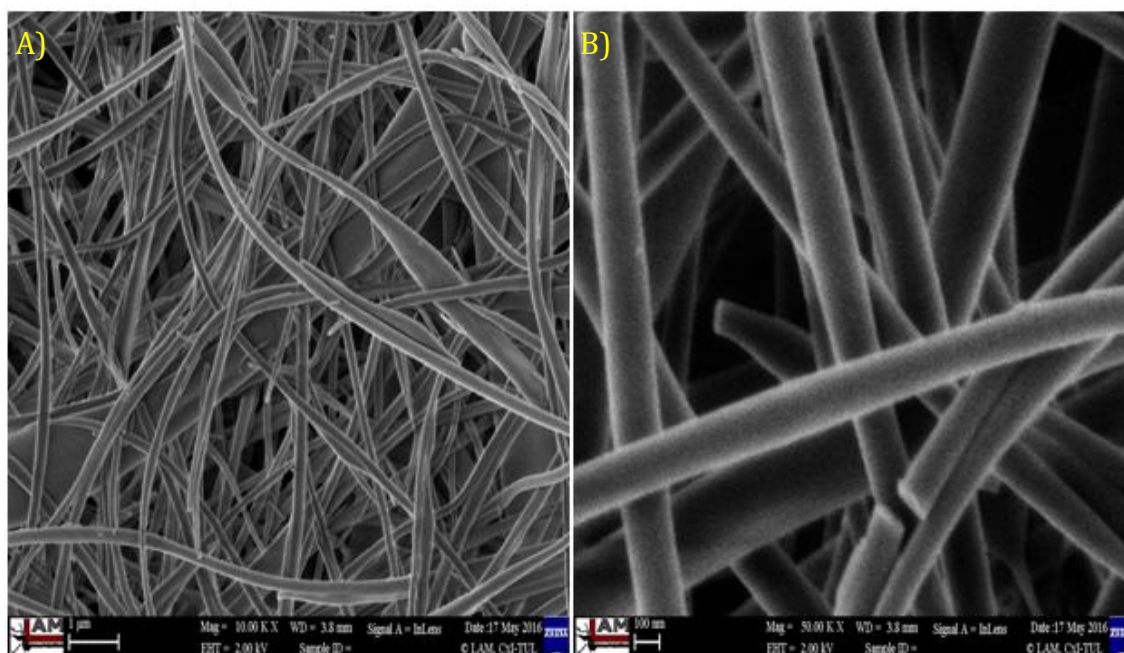


Obrázek 22: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 3 po dobu 10 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)

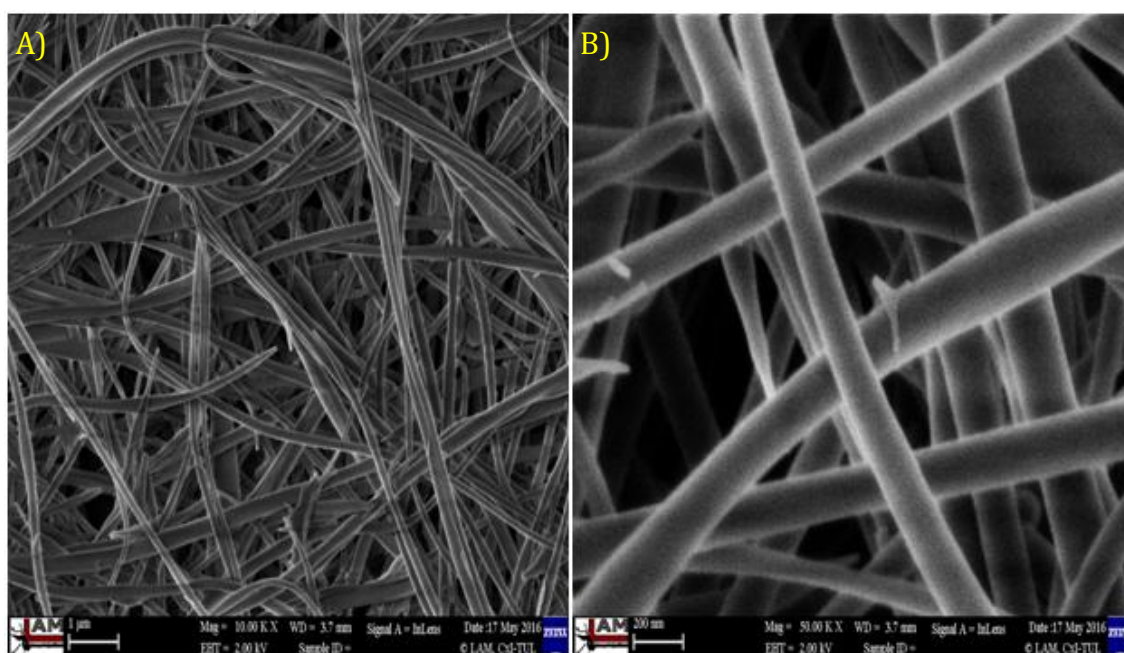


Obrázek 23: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 3 po dobu 15 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)

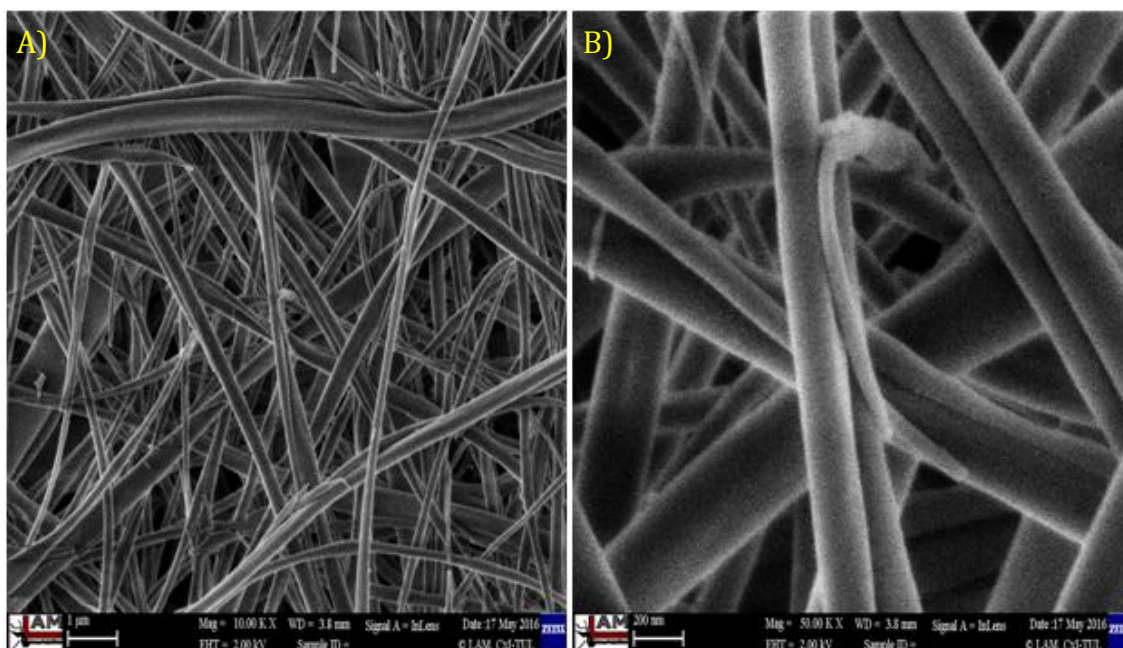
Příloha C



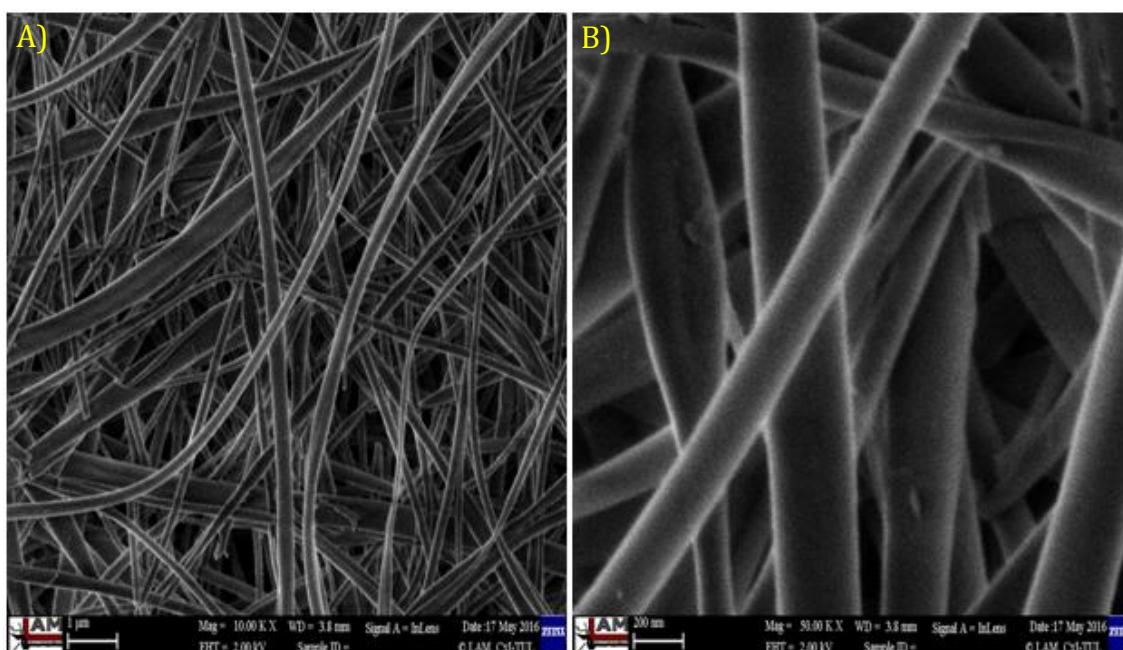
Obrázek 24: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 6 po dobu 1 hodiny, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)



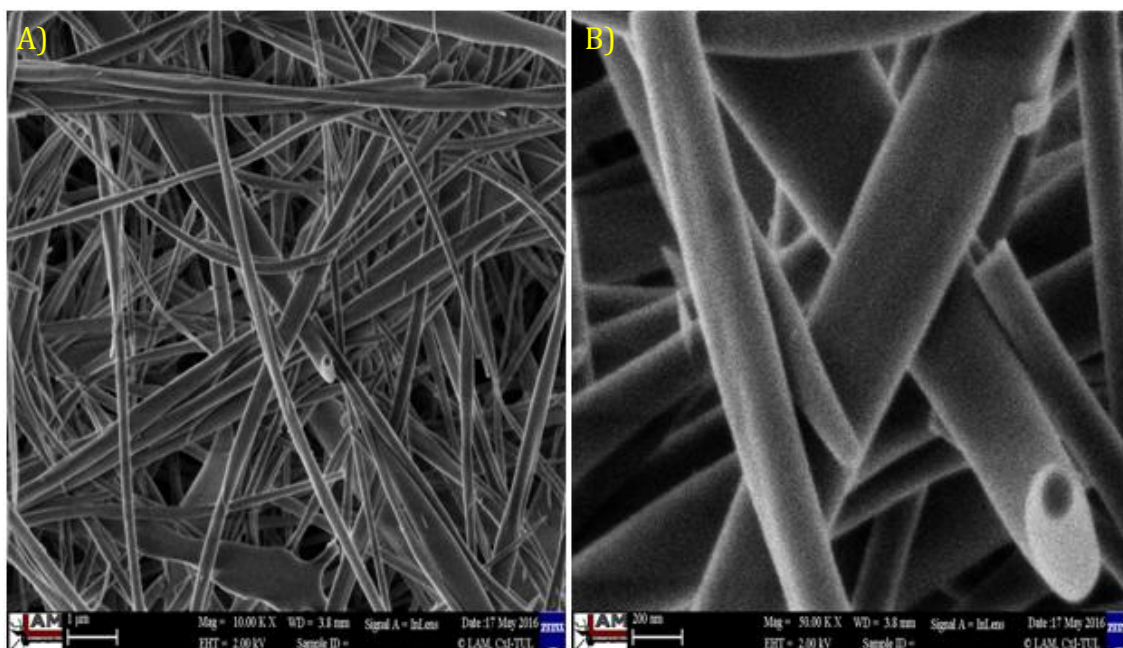
Obrázek 25: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 6 po dobu 3 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)



Obrázek 26: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 6 po dobu 5 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)



Obrázek 27: Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 6 po dobu 10 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)



Obrázek 28: *Struktura křemičitých nanovláken po imobilizaci HA při pH = 6 po dobu 15 hodin, zvětšení 10kx (A) a 50kx (B)*